Aus der Abteilung Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Kochsiek
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Reninfreisetzung aus menschlichen Nierenschnitten und ihre Beeinflussung durch Noradrenalin, Isoproterenol und Propranolol

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Michael Sauter
aus Tuttlingen

1980

Aus der Abteilung Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Kochsiek
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Reninfreisetzung aus menschlichen Nierenschnitten und ihre Beeinflussung durch Noradrenalin, Isoproterenol und Propranolol

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Michael Sauter
aus Tuttlingen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. G. Rassner
1. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Hayduk
	(Professor Dr. K. Kochsiek)
2. Berichterstatter:	Professor Dr. S. Heller

Inhaltsverzeichnis:

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	1
1.2.	Renin	3
1.3.	Kontrolle der Reninfreisetzung	3
1.3.1.	Gefäß- oder Barorezeptor	4
1.3.2.	Macula densa	4
1.3.3.	Autonome Kontrolle der Reninfreisetzung	5
1.4.	Fragestellung	6
2.	Material und Methode	7
2.1.	Untersuchungsmaterial	7
2.1.1.	Nieren	7
2.1.2.	Verwendete Substanzen	8
2.2.	Methode	9
2.2.1.	Entnahme der Nieren	9
2.2.2.	Herstellung der Nierenschnitte	9
2.2.3.	Zusammenstellung der Inkubationspuffers	10
2.2.4.	Inkubation	10
2.2.5.	Renin im Nierengewebe	11
2.2.6.	Substratansatz	12
2.2.7.	Radioimmunoassay von Angiotensin I (AI)	13
2.2.8.	Berechnung der Ergebnisse des RIA	17
2.2.9.	Proteinbestimmung	18
2.2.10.	Inkubation von Renin in Abwesenheit von Nierengewebe	20
2.2.11.	Statistische Analyse	20
3.	Ergebnisse	21
3.1.	Renale Reninkonzentration (RRC)	21
3.2.	Kontinuierliche Inkubation	24
3.2.1.	Inkubation in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer	24
3.2.2.	Inkubation in Phosphatpuffer	28
3.2.3.	Inkubation einer Reninlösung ohne Nierengewebe	28
3.2.4.	Reninfreisetzung während der Vorinkubation	30
3.2.5.	Freisetzung von LDH und GOT	33

3.3. Reninfreisetzung bei Wechsel des Inkubationsmediums 34
3.3.1. Kontrollinkubation ohne Pharmaka 34
3.3.2. Einfluß von Pharmaka auf die Reninfreisetzung 34
3.3.2.1. l-Ascorbinsäure 34
3.3.2.2. l-Noradrenalin 34
3.3.2.3. dl-Isoproterenol 36
3.3.2.4. dl-Propranolol 36
3.3.2.5. l-Noradrenalin plus dl-Propranolol 36
3.3.2.6. dl-Isoproterenol plus dl-Propranolol 36
3.3.3. Freisetzung von LDH und GOT 36
4. Diskussion 41
4.1. Diskussion der Methode 41
4.2. Inkubation mit Pharmaka 43
5. Zusammenfassung 47
6. Literaturverzeichnis 48

1. Einleitung

1.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das RAAS ist wesentlich an der Regulation von Elektrolyt- und Wasserhaushalt sowie Blutdruck beteiligt und unterliegt der Steuerung durch diese Größen (77,80,81,116).

Renin katalysiert die Abspaltung des Decapeptids Angiotensin I von dem in der Leber gebildeten Glykoprotein Angiotensinogen (78). Angiotensin I seinerseits wird durch das "converting enzyme" vorwiegend im Lungenkreislauf (71) in das Octapeptid Angiotensin II überführt (90). Diese Umwandlungen erfolgen im zirkulierenden Blut, möglicherweise aber auch innerhalb der einzelnen Nephren (43,96) und in anderen Organen (39,83).

Angiotensin II, ein wirksamer Vasopressor und Stimulator der Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde (59), wird durch mehrere Angiotensinasen in größtenteils unwirksame Metaboliten gespalten. Lediglich dem Heptapeptid "des-Asp-Angiotensin II" (Angiotensin III) wird noch eine ausgeprägte aldosteronstimulierende Wirkung zugeschrieben (13).

Aldosteron beeinflußt den Natrium-, Kalium- und Wasserhaushalt des Organismus. Es ist für die Rückresorption von Natriumionen im Austausch gegen Kalium- und Wasserstoffionen vor allem im distalen Tubulus der Nieren verantwortlich. Parallel dazu wird der Wasserhaushalt reguliert (88).

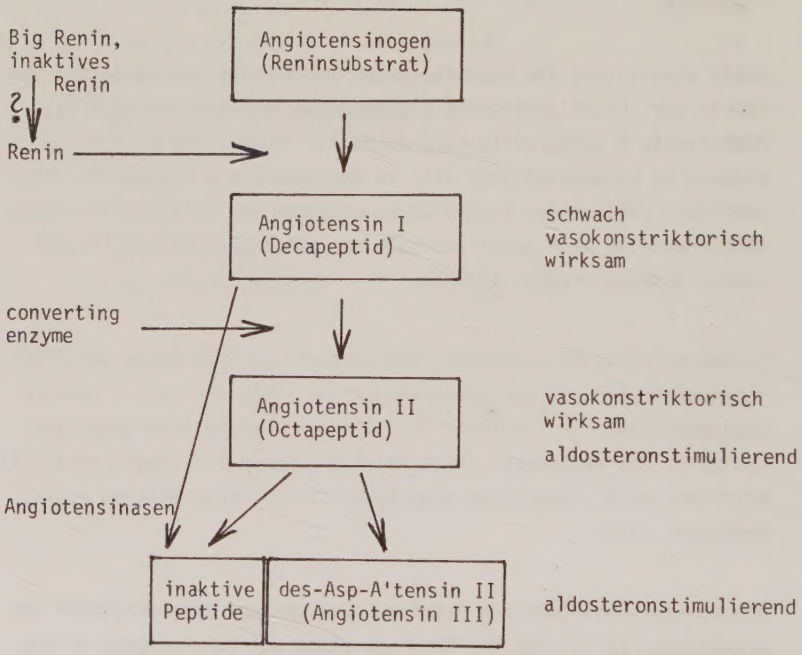


Abb. 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

1.2. Renin

Renin ist ein proteolytisches Enzym. Das Molekulargewicht beträgt beim Menschen etwa 42000 (107). Weiterhin wurden reninähnliche Enzyme - vielleicht Vorstufen - mit Molekulargewichten von 60000 (31) und 150000 (8) entdeckt.

Außer der Niere gibt es noch andere Organe, die Renin oder reninähnliche angiotensinspaltende Enzyme speichern und wahrscheinlich auch synthetisieren (47,48): Gehirn (39,83), Uterus (35), Speicheldrüsen (66) und die Arterienwände (48,84). Diese extrarenale Reninbildung macht jedoch nur einen kleinen Teil der gesamten Sekretion von Renin aus.

In der Niere wird Renin zum größten Teil in den Granula der juxtaglomerulären Zellen (JG cells) in der Wand der afferenten Arteriole gebildet und gespeichert (30,34,40,75). Diese granulierten Zellen werden heute allgemein als hochdifferenzierte Derivate von glatten Gefäßmuskelzellen angesehen (30,75,80). Afferente und efferente Arteriole sind anatomisch und funktionell mit der Macula densa, spezialisierten Zellen der Wand des distalen Tubulus, verbunden (75). Juxtaglomeruläre Zellen und Macula densa werden zusammen als juxtaglomerulärer Apparat bezeichnet.

1.3. Kontrolle der Reninfreisetzung

Mehrere Faktoren kontrollieren die Freisetzung von Renin. DAVIS teilte die Mechanismen, die die Reninfreisetzung kontrollieren, 1973 folgendermaßen ein (29):

- Intrarenale Faktoren. Dabei faßt er den Gefäßrezeptor des Vas afferens (s.1.3.1.) und den Natriumrezeptor der Macula densa (s. 1.3.2.) zusammen.
- Sympathische Faktoren (s. 1.3.3.)
- Humorale Faktoren (Substanzen wie Natrium, Kalium, ADH und Angiotensin II).Darauf soll nicht weiter eingegangen werden.

1.3.1. Gefäß- oder Barorezeptor

TOBIAN vermutete 1959, daß die juxtaglomerulären Zellen in der Wand der afferenten Arteriole als sogenannte "Dehnungsrezeptoren" wirken und ihre Reninsekretionsrate entsprechend dem Dehnungsgrad der Arterienwand ändern (98).

In den letzten Jahren konnte diese Vermutung durch zahlreiche Untersuchungen im Tierversuch gestützt werden. KALOYANIDES und Mitarbeiter (57) sowie CHURCHILL und Mitarbeiter (25) fanden bei Versuchen in vivo, HOFBAUER et al. (50) bei Experimenten an isoliert perfundierten Rattennieren eine umgekehrte Beziehung zwischen Reninsekretionsrate und Nierenperfusionsdruck. BLAINE und Mitarbeiter (11,12) grenzten in ihren Versuchen mit "nicht filtrierenden", denervierten Hundenieren in vivo den Gefäßrezeptor von anderen Einflüssen wie Macula densa und sympathischer Innervation ab. Sie fanden steigende Reninfreisetzung bei erniedrigtem Blutvolumen (nach Blutverlust) und gesenktem Blutdruck (durch Aortendrosselung).

Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, daß verminderte Dehnung der Gefäßwand der afferenten Arteriole zur Aktivierung des Gefäßrezeptors führt (30,36).

1.3.2. Macula densa

Schon 1939 vermutete GOORMATIGH eine funktionelle Beziehung zwischen der Macula densa und den juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriole (40). Morphologisch hat die Macula densa engen Kontakt sowohl zur afferenten als auch zur efferenten Arteriole (24).

VANDER (100) und THURAU (93) postulierten Mitte der sechziger Jahre aufgrund ihrer Experimente einen Rezeptor in der Macula densa, der auf Änderungen der tubulären Natriumkonzentration oder Natriummenge anspricht. Über das eigentliche Signal, das dieser Rezeptor aufnimmt, waren sich diese Autoren jedoch uneinig.

VANDER (100) und NASH et al. (70) vermuteten eine umgekehrte Beziehung zwischen Reninfreisetzung und entweder Natriummenge an der Macula densa oder des davon abhängigen Natriumtransports durch die Macula densa-Zellen. Diese Theorie erhielt in den letzten Jahren durch die Arbeiten von FREEMAN (37) und DIBONA (33) neue Unterstützung,

Auf der anderen Seite sahen THURAU et al. (93,96), MEYER et al. (68) und COOKE und Mitarbeiter (26) eine erhöhte Natriumkonzentration an der Macula densa als Ursache für die Erhöhung der Reninfreisetzung. In neueren Veröffentlichungen (94) meint THURAU, daß die Macula densa auf eine Kombination von Natrium- und Chlorionen reagiert. THURAU (95) und SCHNERMANN und Mitarbeiter (86) nehmen die Existenz eines intrarenalen negativen Feed-back-Mechanismus zur Kontrolle der glomerulären Filtrationsrate (GFR) der einzelnen Nephren an, der bei erhöhter Natrium- und Chloridkonzentration an der Macula densa durch intrarenale Reninfreisetzung und Angiotensin-II-Bildung über präglomeruläre Vasokonstriktion die GFR des einzelnen Nephrons verringert.

1.3.3. Autonome Kontrolle der Reninfreisetzung

BARAJAS (6,7) und WÅGERMARK et al. (106) zeigten in mikroskopischen und histochemischen Studien die Existenz sympathischer Nervenendigungen an den juxtaglomerulären Zellen.

Elektrische Stimulation der Nierennerven führte zu Reninfreisetzung und zu renaler Vasokonstriktion (53,54,63). Durch Denervierung der Nieren oder Anästhesierung der Nerven konnte die Reninausschüttung im Gefolge verschiedener Stimuli - durch Furosemid erzeugter Salzverlust (115), Aortenstenose (115), elektrische Reizung der Medulla oblongata (79) oder des Hypothalamus (115), geringgradige Hämorrhagie (20) - ganz oder teilweise verhindert werden.

Heute sprechen die Mehrzahl der Befunde für eine direkte Beeinflussung der Reninsekretion über einen intrarenalen ß-Rezeptor (3,4,30). Dabei soll es sich um einen $ß_2$-Rezeptor handeln (55,110).

1.4. Fragestellung

Es ist in vivo schwierig, die indirekte Wirkung von elektrischer Stimulation und von Katecholaminen über Veränderungen des systemischen oder renalen Blutflusses von ihrer direkten Wirkung auf die Reninsekretion zu unterscheiden (75). Zur Differenzierung der verschiedenen Einflüsse waren deshalb in vitro-Versuche notwendig.

Von vielen Autoren wurde die Wirkung der Katecholamine an Nierenschnitten (2,23,85,109), isolierten Glomeruli (9,14) und isolierten Nierencortexzellen (69) untersucht. Bevorzugt wurde Nierenmaterial tierischen Ursprungs verwendet, lediglich ROSSET und VEYRAT (85) untersuchten die Reninfreisetzung aus menschlichen Nierenschnitten, hergestellt aus Nieren, die bei Nephrektomien wegen renalen Erkrankungen entfernt worden waren.

In der vorliegenden Arbeit sollte, unabhängig von hämodynamischen Einflüssen, die bei in-vivo-Bedingungen nicht auszuschließen sind, in vitro die Reninfreisetzung an Nierenschnitten aus pathologisch-histologisch weitgehend "normalem" menschlichem Nierengewebe untersucht werden.
Darüber hinaus sollte der Einfluß von l-Noradrenalin, einem α- und ß-Stimulator, von Isopropylnoradrenalin (Isoproterenol), einem ß-Stimulator und von Propranolol, einem ß-Blocker, auf die Reninfreisetzung untersucht werden.

2. Material und Methode

2.1. Untersuchungsmaterial

2.1.1. Nieren

Es wurden menschliche Nieren verwendet, die bei Operationen in der

- Urologischen Universitätsklinik Tübingen
  (Direktor: Professor Dr. K.H. Bichler)
- Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen
  (Direktor: Professor Dr. L. Koslowski)
- Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Reutlingen
  (Chefarzt: Professor Dr. H. Geisbe)

entnommen wurden.[a]

Die Indikationen zur Operation waren:

- Hypernephroides Karzinom	M.H.	♀ 69 J.[b]
	S.E.	♀ 63 J.
	K.W.	♂ 54 J.
	S.P.	♂ 44 J.
- Karzinombedingter Ureterverschluß	B.G.	♂ 73 J.
- Strahlenbedingter Ureterverschluß	B.L.	♀ 65 J.[b]
- Nierenbeckenstein (Polresektion)	B.M.	♀ 53 J.[b]
- Nierentuberkulose	K.P.	♀ 49 J.[b]
- Ganglioneurom mit Einengung der Arteria renalis	F.K.	♂ $1\frac{1}{2}$ J.[b]

Zur Herstellung von Schnitten zu Inkubationsversuchen und zur Bestimmung der Reninkonzentration im Gewebe wurden makroskopisch möglichst unveränderte Teile (z.B. tumorfreier Bezirk) ausgewählt.

---

[a] Den Direktoren dieser Kliniken bin ich für die Überlassung des Untersuchungsmaterials sehr dankbar.

[b] wurde nur zu methodischen Untersuchungen benutzt, nicht zur Inkubation mit Pharmaka.

2.1.2. Verwendete Substanzen

zur Inkubation:

L-Ascorbinsäure (Vitamin C)	MERCK
N-Isopropyl-DL-noradrenalinhydrochlorid = DL-Isoproterenol-HCl = Isoprenalin-HCl = Aludrin^{R}	EGA-Chemie
L-Noradrenalin-HCl	FLUKA
DL-Propranolol (Dociton^{R})	ICI

zur Reninbestimmung:

Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) = Titriplex III	MERCK
Neomycinsulfat	SEWA
Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Puffer)	MERCK
8-Hydroxychinolin Dimercaprol Angiotensin I Angiotensin I-Antiserum (Kaninchen) ^{125}J-Angiotensin I Lysozym Dextran-Charcoal	Reagentiensatz zur Bestimmung der Plasmareninaktivität der Firma BECTON-DICKINSON (1o)

Sonstiges:

Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	MERCK
Kupfersulfat ($CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$)	MERCK
Natrium-Kalium-Tartrat	MERCK
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	MERCK

2.2. Methode

2.2.1. Entnahme der Nieren

Die Operationen wurden üblicherweise in Halothan/Lachgas-Narkose durchgeführt (in einem Fall: Neuroleptanalgesie + Lachgas). Prämedikation: Atropin (0.5mg) und Thalamonal (0.5ml bis 1.5ml). Sonstige Medikation: Thiopental (Trapanal^{R}), Succinylbicholin (Succinyl^{R}), Pancuroniumbromid (Pancuronium Organon^{R}), Gallamin (Flaxedil^{R}).

Nach Entnahme wurden die Nieren noch im Operationssaal durch einen Frontalschnitt (Brötchenschnitt) halbiert und von einer der Hälften ein makroskopisch unverändertes Stück (bei Tumornieren: tumorfreier Bezirk) durch einen Horizontalschnitt abgetrennt. Dieses wurde in 0.9%-NaCl-Lösung (4^{o}C) gegeben und im Labor sofort weiterverarbeitet.

2.2.2. Herstellung der Nierenschnitte

Die folgenden Arbeiten erfolgten alle im Eisbad bei 4^{o}C.
Vor der weiteren Verarbeitung wurde das Nierenstück von Fett- und Bindegewebe befreit. Durch einen Horizontalschnitt wurde ein ca. 5mm dickes Stück abgeschnitten. Dieses Gewebestück wurde zwischen zwei gegeneinandergepreßten Styroporplatten mit einer Rasierklinge in mehrere ca. 0.5mm dicke, möglichst gleichmäßige Schnitte lamelliert (je ungefähr 15o-25omg schwer). Jeder Schnitt wurde sofort in physiologische Kochsalzlösung gegeben. Nach Herstellung aller (im allgemeinen zehn) Schnitte, wurden sie am Gefäßrand abgestreift, in einem Erlenmeyerkolben gewogen und mit 20 ml 4^{o}C kaltem Inkubationspuffer bedeckt.

Das übrige Nierengewebe wurde zur Bestimmung der Reninkonzentration im Gewebe luftdicht verpackt und bei -20^{o}C eingefroren.

2.2.3. Zusammensetzung des Inkubationspuffers

Zur Inkubation wurde folgender frisch hergestellte Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer verwendet:

NaCl 114.1 mM, KCl 4.6 mM, $CaCl_2$ 2.4 mM, $MgSO_4$ 1.1 mM, $NaHCO_3$ 24,0mM, KH_2PO_4 1.1 mM, Glucose 10.1 mM.

Der Puffer wurde vor Gebrauch mindestens 15 Minuten lang mit einer Mischung aus 95% O_2 und 5% CO_2 (Carbogen) durchströmt. Der pH betrug 7.4, die Osmolalität wurde als 309 mosmol/kg berechnet und als 290 mosmol/kg gemessen.

Für weitere Versuche wurde ein Phosphat-Puffer verwendet, den BLENDSTRUP et al. (14) bei ihren Inkubationen beschrieben :

NaCl 105.4 mM, KCl 7.0 mM, $CaCl_2$ 2.0 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, Na_2HPO_4 2.13 mM, NaH_2PO_4 0.32 mM, Glucose 11.0 mM, Saccharose 50.4 mM.

Dieser Puffer wurde während der Inkubation mit 100% O_2 durchströmt. Der pH betrug 7.4, die Osmolalität betrug 305 mosmol/kg (berechnet) und 285 mosmol/kg (gemessen).

2.2.4. Inkubation

Die Inkubation erfolgte in einer von uns modifizierten Warburg-Apparatur. Die Erlenmeyerkolben mit den Nierenschnitten tauchten in ein Wasserbad mit konstanter Temperatur (37°C oder 4°C). Die Schüttelfrequenz betrug 44/min, die Amplitude 4cm. Durch eine Pasteurpipette in jedem Erlenmeyerkolben wurde das Medium mit dem oben schon erwähnten Sauerstoff/Kohlendioxid-Gemisch Carbogen bzw. beim Phosphat-Puffer mit reinem Sauerstoff durchperlt.

a) kontinuierliche Inkubation (wie 18,22,46,72,72,104)
Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C (Vorinkubation) wurde der Schnitt in 20 ml neues Medium gegeben und über 180 Minuten weiterinkubiert (bei 37°C oder 4°C). Zwei Minuten nach dem Mediumwechsel, dann nach 10min,20min,30min,60min und 180min wurden kleine Proben (200 µl) entnommen und zur Reninbestimmung bei -20°C eingefroren. Die Entnahme zwei Minuten nach Wechsel des Mediums diente zur Bestimmung der passiv durch die Manipulation freigesetzten Reninmenge.

b) Inkubation in vier Perioden (wie 85,109)

Nach 20 Minuten Vorinkubation bei 37°C erfolgte die Hauptinkubation in vier aufeinanderfolgenden Perioden mit je 20 Minuten Dauer. Zwischen jeder Inkubationsperiode wurde das Medium gewechselt. Die Probenentnahme erfolgte aus dem Medium nach Ende einer Periode. Pharmaka, deren Einfluß auf die Reninfreisetzung untersucht wurde, wurden in der dritten Periode dem Medium zugegeben.

Es waren: Ascorbinsäure $6 \cdot 10^{-3}$M,
L-Noradrenalin 10^{-8}M, 10^{-7}M, 10^{-6}M, 10^{-5}M, 10^{-4}M.
DL-Isoproterenol 10^{-8}M, 10^{-7}M, 10^{-6}M, 10^{-5}M, 10^{-4}M.
DL-Propranolol 10^{-8}M, 10^{-7}M, 10^{-6}M, 10^{-5}M, 10^{-4}M.

Bei weiteren Versuchen wurde Propranolol in den Phasen I bis III zugegeben, in Phase III zusätzlich Noradrenalin oder Isoproterenol. Als Vergleich wurden zwei ohne Pharmakazusatz inkubierte Kontrollschnitte benutzt. Periode III wurde mit der vorangegangenen Periode II und zusätzlich mit dem Kontrollschnitt verglichen. Die Berechnung erfolgte also nach folgender Formel:

$$\frac{c_{III}}{c_{II}} \cdot \frac{c_{II\,K}}{c_{III\,K}}$$

(c_{III}: Reninkonzentration in der mit Pharmaka inkubierten Periode III,
c_{II}: Reninkonzentration in der vorangehenden Periode II,
$c_{III\,K}$: Reninkonzentration in der Kontrollperiode parallel zu Periode III,
$c_{II\,K}$: Reninkonzentration in der Kontrollperiode parallel zu Periode II.)

2.2.5. Renin im Nierengewebe

Zur Bestimmung der Reninkonzentration im Nierengewebe zu diagnostischen und zu Forschungszwecken wurde von mehreren Autoren eine standardisierte Methode beschrieben und weiterentwickelt (16,42,47,65, 76,113).

Wir bestimmten aus einem dem Inkubationsmaterial unmittelbar benachbarten Gewebestück nach dieser Methode die renale Reninkonzentration (RRC).

Das bei -20°C unter Luftabschluß eingefrorene Gewebestück wurde bei Zimmertemperatur unvollständig bis zur Schneidfähigkeit wieder aufgetat. Ab jetzt erfolgten alle Schritte bei 4°C. Die Kapsel und eine 1mm dicke subkapsuläre Schicht wurden entfernt. Auf einer senkrecht zur Schichtung der Niere geführten Schnittfläche sind Zona corticalis, Zona corticomedullaris und Medulla zu unterscheiden. Aus der Zona corticalis und der Zona corticomedullaris wurden jeweils 300 bis 500mg Gewebe mit einem Skalpell entnommen. Die Gewebeproben wurden gewogen, mit einer Schere zerkleinert und in einem Homogenisator (FISHER Pyrex Nr. 7727) in 5ml 0.9% NaCl-Lösung homogenisiert.

Nach Zentrifugation der homogenisierten Proben in der Kühlzentrifuge (Universal Junior I KS/Heraeus-Christ/15min bei 2700g) wurde der Überstand dekantiert und aufbewahrt, das Sediment in weiteren 5ml Kochsalzlösung mit einem Spatel resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert.

Die Überstände wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.6. Substratansatz

Für eine direkte radioimmunologische Bestimmung kann das Reninmolekül derzeit noch nicht befriedigend rein dargestellt werden (62). Deshalb wird im Substratansatz durch die unbekannte Menge Renin in der Probe aus einem Überschuß an Substrat (Angiotensinogen) eine der Reninmenge proportionale Menge Angiotensin I gebildet, die im Radioimmunoassay (RIA) bestimmt werden kann.

Die Proben aus dem Inkubationsmedium wurden unverdünnt in den Substratansatz gegeben, das Homogenat des Gewebes muß verdünnt werden (1:30 bis 1:50), damit die Renin-Substrat-Reaktion als Kinetik 1. Ordnung verläuft. Das ist nur bei Substratüberschuß der Fall.

Vorgehen

Die nach 2.2.4. und 2.2.5. eingefrorenen Proben wurden vorsichtig aufgetaut.

500 µl folgender Lösung wurden in Reagenzgläser vorgegeben:

Tris-Puffer	0.2 M (mit HCl konz. auf pH 7.4 titriert)
Neomycinsulfat	0.02%
Substratprotein	35 mg/ml
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 mM
Dimercaprol (BAL)	2 mM
8-Hydroxychinolin	3 mM

Das Substratprotein wurde aus dem Plasma erwachsener männlicher Schafe drei Tage nach Nephrektomie nach der Methode von HAAS et al. (44), modifiziert nach BOUCHER et al. (16) gewonnen.

Durch Zugabe von EDTA, Dimercaprol und 8-Hydroxychinolin wird der Abbau von Angiotensin I durch Angiotensinasen und die Umwandlung durch das 'converting enzyme' in Angiotensin II gehemmt (15).

Zu den vorgegebenen 500 µl Substratpuffer wurden bei 4°C 50 µl der (ggf. verdünnten) Probe gegeben und nach gründlichem Durchmischen 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Abkühlen auf 4°C, Zugabe von 100 µl 1N HCl und zehnminütiges Kochen im Wasserbad wurde die Reaktion gestoppt und das Renin denaturiert. Die pH-Verschiebung durch die Salzsäure wurde durch Zugabe von 100 µl 1N NaOH auf pH 7.4 korrigiert und das denaturierte Protein durch die Zentrifugation (15 min/2700g) in der Kühlzentrifuge abgetrennt. Die Überstände wurden eingefroren.

2.2.7. Radioimmunoassay von Angiotensin I

Der Radioimmunoassay geht auf YALOW und BERSON zurück, die im Jahre 1960 eine Methode zur Bestimmung von Insulin im menschlichen Plasma veröffentlichten (114). Darauf aufbauend beschrieben HABER und Mitarbeiter (45) eine Methode zur Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität Der von uns benutzte Reagentiensatz fußt auf dieser Methode.

Prinzip des Tests:

Angiotensin I → Angiotensin I-Antikörper-Komplex

+ Antikörper

^{125}J-Angiotensin I → ^{125}J-A'tensin-Antikörper-Komplex

Wenn der verwendete Antikörper zu markiertem und unmarkiertem Antigen (Angiotensin I) die gleiche Affinität besitzt, konkurrieren unmarkiertes Angiotensin I und markiertes Angiotensin I um die begrenzte Anzahl verfügbarer Antikörperbindungsstellen. Die Menge an antikörpergebundener Radioaktivität ist also umgekehrt korreliert mit der Angiotensin I-Menge in Probe und Standard. Durch ein geeignetes Trennverfahren wird das freie Antigen abgetrennt, danach die Radioaktivität der gebundenen Phase gemessen (10).

Durchführung (siehe auch Tabelle 1):

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Reagentiensatzes der Firma BECTON-DICKINSON und Co. "Plasma Renin Activity Radioimmunoassay Kit (^{125}J)".

In Polystyrolröhrchen wurden verschiedene Mengen (siehe Tabelle 1) Tris-acetat-Puffer 0.1M pH 7.4 mit 0.1% Lysozym gegeben. Dabei wurden die unterschiedlichen Volumina, die im folgenden zugefügt werden sollten, so ausgeglichen, daß am Versuchsende in allen Röhrchen die gleiche Menge Flüssigkeit war. Alle Schritte erfolgten im Eisbad bei 4°C. Zum Puffer wurden mit einer EPPENDORF^{R}-Pipette 50 µl ^{125}J-Angiotensin-Lösung pipettiert (je Röhrchen $<$ 5nCi = 185 Bq) Nach jedem Schritt erfolgte eine gründliche Durchmischung.

Die Standardlösung (5ng/ml) wurde so verdünnt, daß eine aufsteigende Verdünnungsreihe entstand: 25pg, 50pg, 100pg, 200pg, 400pg/100 µl. 100 µl davon wurden in die entsprechenden Standardröhrchen pipettiert. In die Probenröhrchen wurden je 50 µl der wieder aufgetauten Überstände aus 2.2.6. pipettiert.

Bei Bestimmung von Geweberenin wurde den TRACE- und Standardröhrchen noch je 50 µl Nierenleerwert zugesetzt.

Herstellung des Nierenleerwertes:
Homogenisiertes Nierengewebe wurde bei 4°C ohne Substrat 60 Minuten inkubiert und wie übliche Gewebeproben weiterverarbeitet. Der Leerwert soll ein Gewebeäquivalent ohne Angiotensin I darstellen. WOWRA (113) fand eine systematisch zu hohe Bestimmung der RRC ohne Zugabe des Leerwertes.

Zuletzt wurden in alle Röhrchen (außer in TOTAL) 50 µl Angiotensin I-Antiserum vom Kaninchen pipettiert. Nach kräftiger Durchmischung wurden die Ansätze 20 bis 24 Stunden bei 4°C stehengelassen.

Nach dieser Zeit wurden in alle Röhrchen (außer in TOTAL) 1000 µl einer Dextran-Kohle (1:10)-Suspension pipettiert und durchmischt. Nach einer Kontaktzeit von maximal 12 Minuten erfolgte die Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 4°C (15min/2200g).

Um die Kontaktzeit vor Zentrifugation für alle Proben bei Doppelbestimmungen im Mittel konstant zu halten, wurde zunächst jeweils eine der Doppelbestimmungen vom ersten bis zum letzten Röhrchen, danach die zweite vom letzten bis zum ersten Röhrchen pipettiert.

Der Überstand wurde in neue Polystyrolröhrchen dekantiert. Die Zählung der Radioaktivität pro Röhrchen erfolgte im Gamma-Counter (Gamma-Counting-System MR 1032) bei einer Zählzeit von 5 Minuten, jedoch maximal bis 10000 counts. Ausgedruckt wurden die Impulse (counts) pro Minute (cpm) abzüglich einer Untergrundstrahlung von 25 cpm.

	Tris-Puffer	^{125}J-A'tensin I	Probe	Standard	Nieren-leerwert	Antiserum	Dextran-Kohle
TOTAL	1800	50	-	-	-	-	-
TRACE	750 (700)	50	-	-	(50)	-	-
STANDARD 25pg	650 (600)	50	-	100	(50)	50	1000
STANDARD 50pg	-"-	50	-	100	(50)	50	1000
STANDARD 100pg	-"-	50	-	100	(50)	50	1000
STANDARD 200pg	-"-	50	-	100	(50)	50	1000
STANDARD 400pg	-"-	50	-	100	(50)	50	1000
Proben	700	50	50	-	-	50	1000

Tabelle 1: Radioimmunoassay; Reaktionsansatz (alle Angaben: /ul)

Erklärung: TOTAL: Gesamtradioaktivität in Abwesenheit von Antiserum. TRACE = 100%-Bindung = Standard Opg: antikörpergebundenes, radioaktiv markiertes Angiotensin I in Abwesenheit von unmarkiertem Angiotensin I. TOTAL, TRACE und die Standardreihe wurden jeweils dreifach, die Proben doppelt bestimmt.
Weitere Erläuterungen: siehe Text.

2.2.8. Berechnung der Ergebnisse des RIA

2.2.8.1. Erstellung der Eichkurve

Durch Division der Mittelwerte der Standardergebnisse durch den Mittelwert von TRACE erhält man die Bindung Antikörper-radioaktiv markiertes Antigen in Prozent. Wird sie als Ordinate gegen die Standard-Angiotensin-I-Konzentration in pg (Abszisse) aufgetragen, ergibt sich ein exponentieller Verlauf der Standardkurve. Bei Auftragung der Kehrwerte der %Ag-Ak-Bindung gegen die Standard-AI-Konzentration erhält man eine Gerade.

Von dieser Geraden wurde mit der Methode der kleinsten Quadrate die lineare Regression berechnet ($y = mx + c$). Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Taschenrechners SR 51 - II der Firma Texas Instruments.

2.2.8.2. Berechnung der Einzelwerte

Von den cpm-Werten der beiden Einzelmessungen jeder Probe wurde der Mittelwert gebildet, durch Division durch den TRACE-Mittelwert die radioaktive Ag-Ak-Bindung berechnet und deren Kehrwert als y in die Geradengleichung eingesetzt:

$$x = \frac{y - c}{m}$$

x entspricht der Reninmenge im RIA-Röhrchen.

Nach Berücksichtigung der Verdünnung im und eventuell vor dem Substratansatz erhielt man die gesuchte Reninkonzentration:

Renin im Medium: $c = \frac{x \cdot 15}{0.05\,ml}$ Einheit: $\frac{ng\ AT\ I}{h \cdot ml\ Medium}$

Renin im Gewebe: $c = \frac{x \cdot 15 \cdot F \cdot 10ml}{0.05\,ml \cdot m}$; Einheit: $\frac{ug\ AT\ I}{h \cdot gNG}$

Erklärung:
- 15: Verdünnungsfaktor im Substratansatz
- F: Verdünnungsfaktor vor Substratansatz
- 0.05 ml: Volumen der Probe für den RIA
- 10 ml: Volumen des Gewebehomogenats
- m: Masse (Feuchtmasse) des Gewebestücks
- gNG: Gramm Nierengewebe (Feuchtmasse)

2.2.9. Proteinbestimmung

Die Reninkonzentration pro Gramm Feuchtmasse ist Schwankungen durch wechselnden Flüssigkeitsgehalt unterworfen. Exaktere Werte ergibt die Reninkonzentration pro mg Protein.

Die Eiweißkonzentration wurde nach der Methode von LOWRY bestimmt (64): An die zu bestimmenden Proteine werden im alkalischen Milieu Kupferionen angelagert. Dieser Cu^{++}-Protein-Komplex reduziert Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz. Dabei entsteht ein blauer Farbstoff, dessen Konzentration photometrisch gemessen werden kann.

Durchführung:

1) Anreicherung des Proteins

In Plastikröhrchen wurden 3ml bis 5ml des Überstandes aus der Homogenisation (2.2.5.) und 0.3ml bis 0.5ml konzentrierte Perchlorsäure ($HClO_4$) pipettiert und durchmischt. Nach 20 Minuten wurde das ausgefällte Protein durch Zentrifugation (2700g/15min) abgetrennt. Der Überstand wurde sorgfältig abgegossen und verworfen, das Sediment je nach Menge in 0.5ml bis 1.0ml 0.5N NaOH aufgelöst.

2) Eichkurve

Mit einer standardisierten Eiweißlösung (Labtrol/Firma Merz&Dade München) wurde eine Eichkurve erstellt (0.01 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mg/ml). Jedes Reagenzglas enthielt 1.0ml der Eiweißlösung.

3) Proben

Aus den angereicherten Proben wurden mit einer Mikropipette (Capillettor Labora Mannheim) 20 µl in je 1.0ml Aqua bidestillata pipettiert. Alle Werte wurden doppelt angesetzt. 1.0ml Aqua bidest. wurde als Leerwert im folgenden wie die Proben behandelt.

4) Bestimmung

Nach Durchmischen von 1 Teil 1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ und 1 Teil 2% Na-K-Tartrat-Lösung wurden 100 Teile 2% Na_2CO_3 in 0.1N NaOH dazugegeben. 5ml dieser Lösung wurden in jedes Reagenzglas (Probe, Standard, Leerwert) gegeben und durchmischt.

Nach 10 bis 12 Minuten wurden 0.5ml verdünntes Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz hinzugefügt (unverdünntes Reagenz 1:1 mit Aqua bidestillata), die Proben erneut durchmischt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde mit einem Zeiss-Photometer bei 772 nm die Extinktion gegen den Leerwert gemessen.

Die Extinktionen der Standardreihe wurden als Ordinate gegen die Eiweißkonzentrationen als Abszisse aufgetragen und die lineare Regression berechnet (siehe 2.2.8.).

Durch Einsetzen der Extinktionen der Proben in die Geradengleichung wurde die Eiweißkonzentration bestimmt.

Die Eiweißkonzentration im Nierengewebe wurde darausdurch Berücksichtigung der Verdünnungsschritte berechnet:

$$C_{NG} = \frac{c \cdot V_{Sed} \cdot V_{Hom}}{0.02ml \cdot V_{Pr} \cdot m}$$

c = Eiweißkonzentration, berechnet aus der Eichkurve
V_{Sed} = Volumen der 0.5N NaOH, in dem das Sediment gelöst wurde (ml)
V_{Pr} = Volumen der Probe für die Eiweißbestimmung (ml)
V_{Hom} = Volumen des Homogenats (2.2.5.) (ml)
m = Masse des Nierenstücks, das homogenisiert wurde (g)

Einheit: $\frac{\text{mg Protein}}{\text{g Feuchtmasse}}$

Einheit (Renin/Eiweiß): $\frac{\text{ug AT I}}{\text{h} \cdot \text{mg Protein}}$

2.2.10. Inkubation von Renin in Abwesenheit von Nierengewebe

Zur Klärung, ob außer Renin andere aus dem Schnitt ins Medium abgegebene Substanzen die Reninkonzentration beeinflussen (siehe 3.2.4.), wurde Reninlösung folgendermaßen inkubiert:

Lyophilisiertes menschliches Renin ("human renin", Research Standard, A/68/356, Medical Research Council, Mill Hill, London) wurde bei 4°C in 0.9% NaCl-Lösung gelöst. Ein Aliquot (0.2ml) mit 0.01 Unit Renin wurde mit Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer weiter verdünnt und mit wenig 1N NaOH auf pH 7.4 titriert, so daß die Konzentration am Schluß 2mU/ml betrug. Diese nach Verdünnung errechnete Konzentration in der in dieser Arbeit nicht gebräuchlichen Einheit "Unit" entsprach von uns gemessenen 7.1 ng AI/h·ml.

Ein Nierenschnitt (Pat. B.M. ♀) wurde in 20ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer pH 7.4 bei einer Temperatur von 37°C unter Durchströmen mit Carbogen inkubiert (s. 2.2.1. und 2.2.2.).

Nach 15min Vorinkubation und 60min Hauptinkubation wurde der Schnitt entnommen. 200 µl des Hauptinkubationsmediums wurden mit 1.0ml (2mU bzw. 7.1 ng AI/h·ml) der zuvor hergestellten Reninlösung in ein Reagenzglas gegeben und durchmischt. Weitere 1.0ml dieser Reninlösung wurden als Kontrollversuch ohne zugegebenes Medium im folgenden gleich behandelt.

In dem bei 2.2.4. beschriebenen Schüttelinkubator wurden beide Ansätze 180 Minuten lang bei 37°C unter Durchperlen mit Carbogen inkubiert. Zu Beginn, nach 10min, 30min, 60min und 180min wurden 100 µl der Lösung entnommen und zur Bestimmung der Reninkonzentration bei -20°C eingefroren.

2.2.11. Statistische Analyse

Gemittelte Ergebnisse wurden als Mittelwert $\pm$ 'standard error' (SE) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student t-Tests für gepaarte und ungepaarte Beobachtungen.

3. Ergebnisse

3.1. Renale Reninkonzentration (RRC)

In Tabelle 2 sind histologische Diagnosen und Reninkonzentrationen im Nierengewebe aus Zona corticalis (Z.c.) und Zona corticomedullaris (Z.cm.) aufgeführt.

Tabelle 2: Histologische Diagnosen[a] und renale Reninkonzentration der verwendeten Nieren.

Patient	Histologische Diagnose (1+2: histolog.untersuchtes Gewebe 2: zur Inkubation verwendetes Gewebe)	Reninkonzentration (ug AI/mgEW h)	
		Z.cort.	Z.cort.med.
M.H. ♀ 69J.	1) Hypernephroides Ca	-	-
	2) regelrecht aufgebautes Nierengewebe	0.85	0.62
S.E. ♀ 63J.	1) Hypernephroides Ca	-	-
	2) regelrecht aufgebaut, etwas rundzellig infiltriert	0.15	0.12
K.W. ♂ 54J.	1) Hypernephroides Ca	-	-
	2) regelrecht aufgebautes Nierengewebe	0.24	0.26
S.P. ♂ 44J.	1) Hypernephroides Ca	-	-
	2) regelrecht aufgebautes Nierengewebe	1.08	0.78
B.L. ♀ 65J.	1/2) Hydronephrose mäßigen Grades	1.97	1.90
B.G. ♂ 73J.	1/2) Typisch aufgebautes Nierengewebe mit geringgradiger Hydronephrose	2.50	1.32

[a] Für die freundliche Überlassung der pathologisch-histologischen Untersuchungsbefunde bin ich Herrn Professor Dr. A. Bohle sehr dankbar.

Patient	Histologische Diagnose	Reninkonzentration (/ug AI/h mgEW) Z.cort.	Z.cort.med.	
K.P. ♀ 49J.	1/2) Nieren- und Nierenbecken-tbc (teils verkäsend, teils granulierend mit partieller Schrumpfung)	0.25	0.22	
F.K. ♂ $1\frac{1}{2}$J.	1/2) Ganglioneurom, das die mittlere und caudale Arterie der dreifach versorgten Niere stenosiert (s. Abb.2); mangeldurchblutete Niere mit Arealen stärkerer Drosselung der Durchblutung; Hyperplasie der juxtaglomerulärem Apparate.	1.85	1.13	cranial
		8.78	3.73	Mitte
		6.90	-	caudal
B.M. ♂ 53J.	1/2) nicht pathologisch-histologisch untersucht Nierenbeckenstein	0.35	0.29	

Bei vier Tumornieren wurden in makroskopisch unveränderten, mikroskopisch als "regelrecht aufgebaut" (n=3) oder "regelrecht aufgebaut, etwas rundzellig infiltriert"(n=1) beschriebenen Bezirken renale Reninkonzentrationen (RRC) zwischen 0.15 (c) bzw. 0.12 (cm) und 1.08 (c) bzw. 0.78 (cm) /ug AI/h mgEW gefunden. Die Mittelwerte berugen 0.58 $\pm$ 0.23 (c) bzw. 0.45 $\pm$ 0.15 (cm) /ug AI/h mgEW.

Bei einer tuberkulös veränderten Niere (K.P.) wurde die RRC im unteren Normbereich (0.25 bzw 0.22/ug AI/h mgEW) gefunden.

Bei einer teilweise mangeldurchbluteten Niere (F.K./s. Abb. 2) wurden extrem hohe RRC von 6.90 und 8.78 /ug AI/h mgEW (c) bzw. 3.73/ug AI/h mgEW (cm) gemessen. In den angiographisch normal durchbluteten Teilen war die RRC nur leicht erhöht (1.85 (c) bzw. 1.13 (cm) /ug AI/h mgEW).

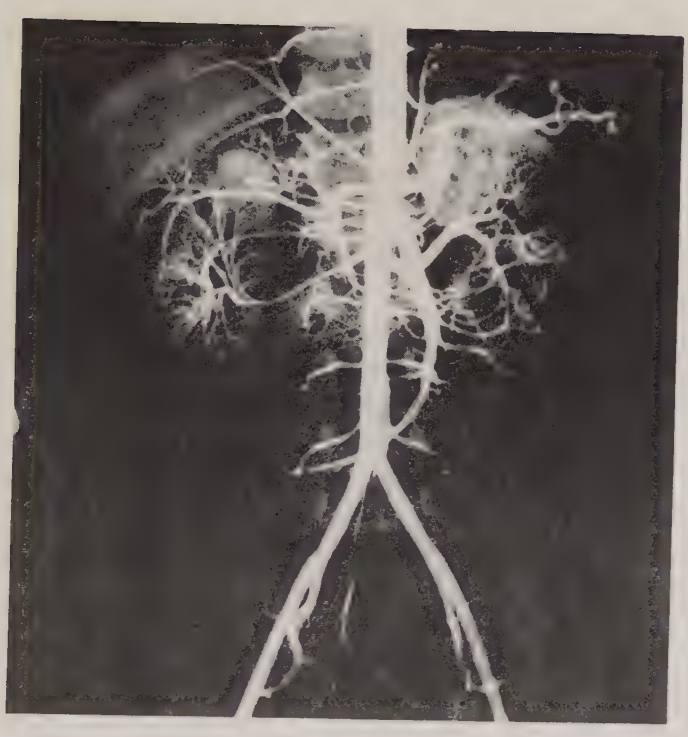


Abbildung 2: Angiographie der Aorta abdominalis und ihrer Äste. Die mittlere und caudale Arterie der dreifach versorgten rechten Niere sind durch ein Ganglioneurom stenosiert (Pat. F.K.).

3.2. Kontinuierliche Inkubation

3.2.1. Inkubation in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer

Es wurde die Reninfreisetzung bei 37°C und 4°C mit und ohne Carbogendurchströmung (95% O_2 und 5% CO_2) untersucht.

Der pH blieb während der Inkubation bei 4°C ohne Carbogen konstant 7.5, bei 37°C ohne Carbogen wurde das Medium zunehmend alkalischer, bei 37°C mit Carbogendurchströmung blieb der pH konstant bei 7.4 (Abbildung 4).

Die im Medium gemessenen Reninkonzentrationen sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Da nach zwei Minuten schon eine erhebliche Menge Renin - vermutlich größtenteils passiv durch die Manipulation beim Badwechsel freigesetzt - im Medium gefunden wurde, wurde die Differenz aus den weiteren Reninwerten und der jetzt als 'Nullwert' bezeichneten 2-Minuten-Probe gebildet.

Die Mittelwerte bei 4°C ohne Carbogendurchströmung ergaben einen nahezu linearen Anstieg bis auf 4243 $\pm$ 2098 ng AI/h nach 180 Minuten. Die sehr große Streubreite erklärt sich durch die von Niere zu Niere unterschiedliche Reninfreisetzung bei unterschiedlich hohen Ausgangskonzentrationen im Nierengewebe. Deshalb werden im folgenden die Reninkonzentrationen im Medium als Prozent des 180min/4°C-Wertes der jeweiligen Niere ausgedrückt.

Bei 37°C ohne Carbogendurchströmung nahmen die Reninkonzentraitonen nach einem signifikant steileren Anstieg als bei 4°C ($p<0.05$ bei 10min) ab der 30 Minute nicht mehr signifikant zu und erreichten am Ende der Inkubation mit 45.4 $\pm$ 9.2 % signifikant ($p<0.0005$) kleinere Werte als bie 4°C.

Bei 37°C mit Carbogendurchströmung stieg die Reninkonzentration nach 10 Minuten geringer an als ohne Carbogen und fiel nach 30 Minuten auf Werte ab, wie sie schon zwei Minuten nach Inkubationsbeginn bestimmt wurden. Im weiteren Verlauf lagen die Reninkonzentrationen sogar noch darunter (Abbildung 3).

Bei 4°C mit Carbogendurchströmung ergab sich ein ähnliches Bild.

Tabelle 3: Reninkonzentration (ng AI/h 20ml) im Medium bei kontinuierlicher Inkubation (Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer) n=8 bzw n=4 (bei $4^{o}C$ + Carbogen)

	2	10	30	60	180 min	
						Pat.
$4^{o}C$	146	153	322	419	1202	M.H.
	123	110	198	270	717	M.H.
	233	337	472	817	1421	K.P.
	331	269	434	460	1641	K.P.
	1275	1247	4717	8806	16022	F.K.
	819	1236	2836	5990	11186	F.K.
	136	156	336	460	1126	B.M.
	122	148	180	218	562	B.M.
$4^{o}C$	1088	1646	1881	2977	2218	F.K.
+	1444	1657	1895	2382	2120	F.K.
O_2/CO_2	201	234	128	104	116	B.M.
	146	178	62	166	72	B.M.
$37^{o}C$	123	135	286	420	437	M.H.
	75	157	198	189	311	M.H.
	251	498	801	791	800	K.P.
	215	454	528	657	683	K.P.
	2921	6359	7640	11027	13727	F.K.
	1389	2926	5263	7012	11252	F.K.
	258	268	310	408	458	B.M.
	118	148	252	238	220	B.M.
$37^{o}C$	174	154	115	86	167	M.H.
+	118	170	151	147	125	M.H.
O_2/CO_2	307	658	527	270	317	K.P.
	249	320	260	213	247	K.P.
	2854	3802	2711	1978	3034	F.K.
	1048	1180	1097	740	1151	F.K.
	248	248	150	124	124	B.M.
	192	204	158	136	70	B.M.

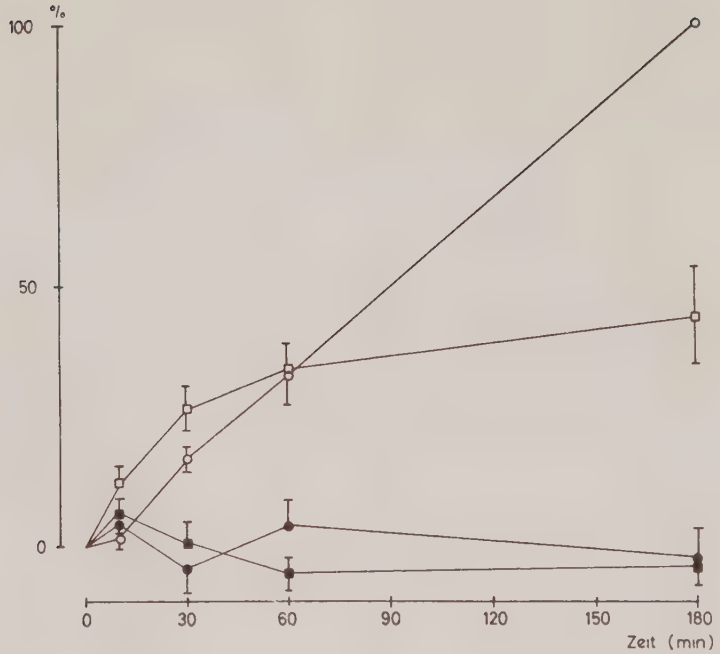


Abbildung 3: Reninfreisetzung (%) bei kontinuierlicher Inkubation
(Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer)
Differenzen zum Zwei-Minuten-Wert (n=8)
Erläuterungen s. Text
180min/4°C-Wert entspricht 100% (◯)
(○ : 4°C ohne Carbogen / □: 37°C ohne Carbogen
● : 4°C mit Carbogen / ■: 37°C mit Carbogen)

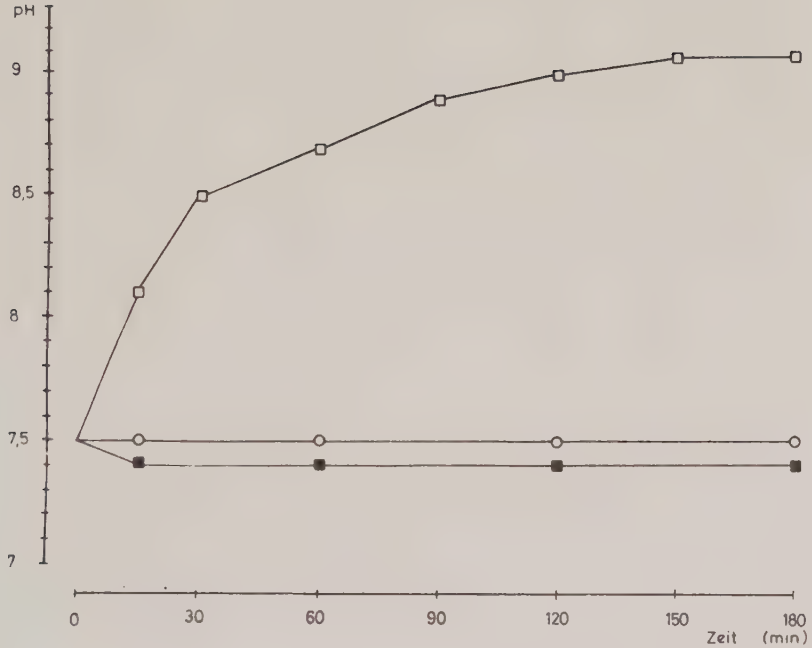


Abbildung 4: pH-Verlauf während 180 Minuten Inkubation.
○ : 4°C ohne Carbogen / □ : 37°C ohne Carbogen
■ : 37°C mit Carbogen.

3.2.2. Inkubation in Phosphatpuffer

Zum Vergleich wurde die Reninfreisetzung in Phosphatpuffer untersucht, s. a. Inkubation von isolierten Glomeruli von BLENDSTRUP und Mitarbeiter (14).

Die Schnitte wurden bei 37°C und 4°C über 90 Minuten unter Durchströmen mit 100% Sauerstoff inkubiert.

Dabei ergaben sich folgende Reninkonzentrationen:

Tabelle 4: Reninkonzentration in Phosphatpuffer (ng AI/h·20ml) Niere B.L. ♀ n=2

	2	10	30	60	90 min
4°C	128	253	456	947	1065
	137	242	436	667	676
37°C	145	203	213	338	224
	149	218	235	161	198

Bei Auftragung als Differenz zum Nullwert (2min-Wert) ergab sich bei 4°C ein nahezu linearer Anstieg bis 60 Minuten auf 675 ± 145 ng AI/h·20ml, zwischen der 60. und 90. Minute ein weniger steiler Anstieg bis 737 ± 199 ng AI/h·20ml.

Bei 37°C nahm die Reninkonzentration bis zur 60. Minute nur geringfügig auf 103 ± 91·ng AI/h·20ml zu; bis zur 90. Minute fiel die Konzentration sogar wieder ab.

3.2.3. Inkubation einer Reninlösung ohne Nierengewebeschnitt

Bei der kontinuierlichen Inkubation bei 37°C unter Carbogendurchströmung über 180min folgte der raschen Reninfreisetzung bis zur 10. Minute ein deutlicher Abfall der Reninkonzentration im Medium; nach der 30. Minute werden sogar die Werte 2 Minuten nach Badwechsel unterschritten (siehe Abbildung 6).

Unter diesen Bedingungen ist die Untersuchung des Einflusses von Pharmaka unmöglich. Zur Klärung dieses unerwarteten

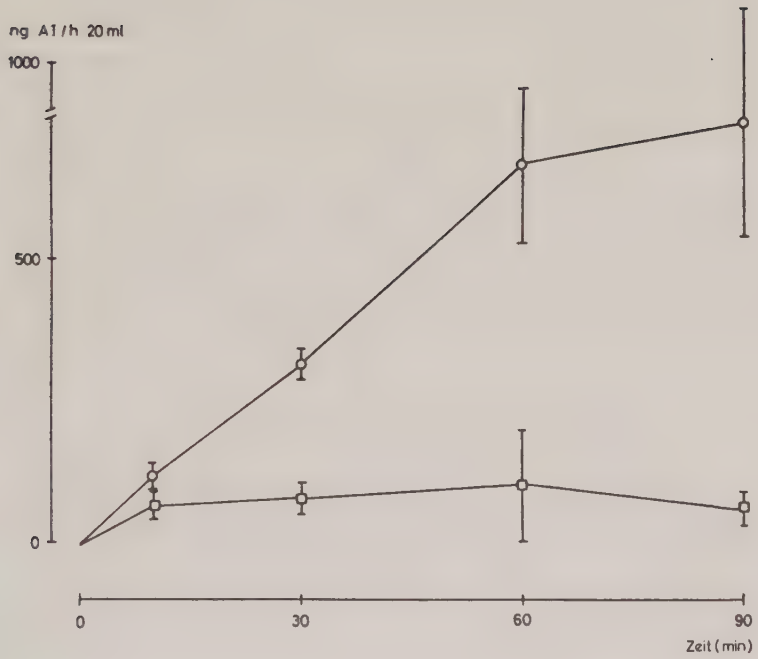


Abbildung 5: Reninfreisetzung ins Medium bei kontinuierlicher Inkubation (Phosphat-Puffer). Differenzen zum Zwei-Minuten-Wert (n=2) Erläuterungen s. Text
○ : 4°C / □ : 37°C

Befundes wurde folgender Versuch durchgeführt, der Aufschluß darüber geben sollte, ob in das Medium abgegebenes Renin dort inaktiviert bzw. abgebaut wird:
Ein Nierenschnitt wurde in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer zuerst 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert und dann 60 Minuten bei 37°C weiterinkubiert, beides unter Carbogendurchströmung. 200 µl des inkubierten Mediums wurden mit 1.0ml einer Reninlösung vermischt. Als Kontrolle wurde 1.0ml reiner Reninlösung verwendet (genaue Methode siehe 2.2.10.). Die Konzentration wurde von uns als 7.1 ng AI/h ml gemessen.

Mischung und Kontrolle wurden 180 Minuten lang bei 37°C unter Carbogendurchströmung inkubiert.

Die Reninkonzentration der Kontrollösung nahm nach einem initialen Abfall nur noch wenig ab (von 5.6 $\pm$ 0.4 ng AI/h·ml nach 10 Minuten auf 4.8 $\pm$ 0.6 ng AI/h·ml nach 180 Minuten), während die mit Medium versetzte Lösung von 7.3 $\pm$ 0.1 nach 10 Minuten auf 2.8 $\pm$ 0.6 ng AI/h·ml abfiel (siehe Abbildung 7).

3.2.4. Reninfreisetzung während der Vorinkubation

Es wurde die während der Vorinkubation freigesetzte Reninmenge mit der Gesamtreninmenge im Schnitt vor der Inkubation verglichen. Da die Reninmenge im Schnitt vor der Inkubation nicht bestimmt werden konnte, wurde die Reninkonzentration eng benachbarter Gewebeschnitte bestimmt und auf die Masse (Gramm Nierengewebe) des inkubierten Schnittes umgerechnet. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle 5 ersichtlich.

Tabelle 5: Reninmenge im Vorinkubat bezogen auf die Gesamtreninmenge im Schnitt vor der Inkubation (%).

Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer:	M.H.	11.1	B.M.	4.8
		8.8		5.4
	K.P.	20.3		5.5
		18.0		6.2
Phosphat-Puffer:	B.M.	3.4		3.7
		4.4		6.1

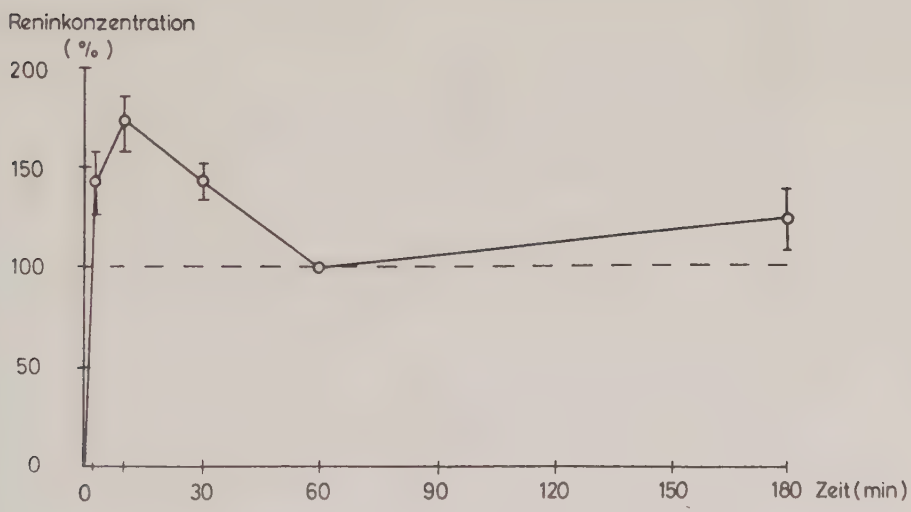


Abbildung 6: Reninkonzentration im Medium bei 37°C und Durchströmen mit Carbogen, ausgedrückt als Prozent zur Konzentration bei 60 Minuten (100%).

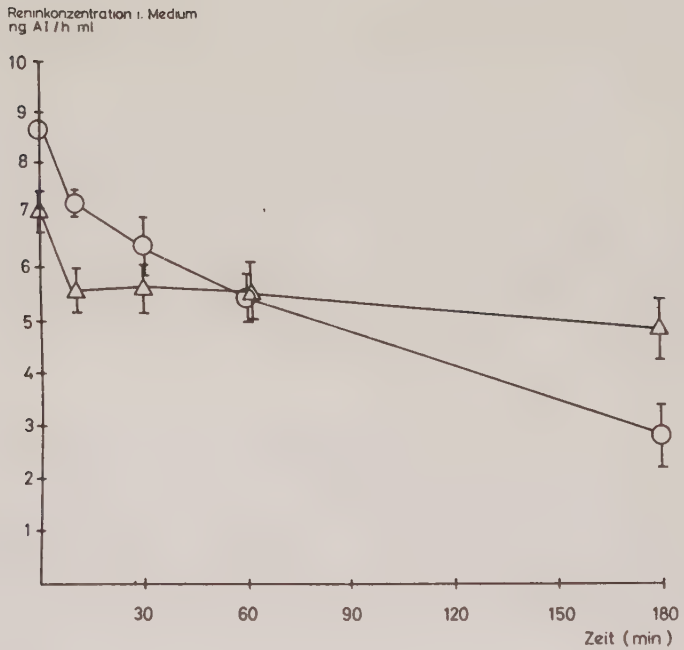


Abbildung 7: Inkubation einer definierten Reninlösung nach Zugabe von eine Stunde vorinkubiertem Medium (○). Kontrolle (△): Reninlösung ohne Zugabe von vorinkubiertem Medium. (n=2).
Erläuterungen s. Text.

Durchschnittlich wurden im Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer 10.0 ± 2.1 Prozent der Gesamtreninmenge (n=8), im Phosphatpuffer 4.4 ± 0.6 Prozent der Gesamtreninmenge (n=4) im Vorinkubat gefunden.

3.2.5. Freisetzung von LDH und GOT[a]

Bei 4°C und 37°C wurde die Freisetzung der Zellenzyme Lactatdehydrogenase (LDH) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) während der kontinuierlichen Inkubation über 180 Minuten gemessen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Konzentration der Enzyme LDH und GOT im Medium, Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (IE/l) n=3

		2	30	180	min
GOT	4°C	0	0	3	
		1	4	9	
		1	3	9	
		0.7 ± 0.3	2.3 ± 1.2	7.0 ± 2.0	
	37°C	3	6	16	
		1	11	24	
		3	11	25	
		2.3 ± 0.7	9.3 ± 1.7	21 7 ± 2.9	
LDH	4°C	9	25	72	
		3	33	94	
		6	36	62	
		6.0 ± 1.7	31.3 ± 3.3	76.0 ± 9.5	
	37°C	22	81	140	
		11	79	157	
		12	67	216	
		15.0 ± 3.5	75.7 ± 4.4	171.0 ± 23.0	

3.3. Reninfreisetzung bei Wechsel des Inkubationsmediums

Da durch die Inkubation über 180 Minuten keine kontinuierliche Reninfreisetzung erreicht werden konnte, wurde nach ROSSET und VEYRAT (85) sowie WEINBERGER et al. (109) die Reninfreisetzung über vier Inkubationsperioden zu je 20 Minuten durchgeführt (siehe 2.2.4.b).

3.3.1. Kontrollinkubation ohne Pharmaka

Die mittlere Reninkonzentration war bei 37°C und Durchströmen mit Carbogen in den vier Inkubationsperioden ungefähr gleich groß, die geringen Unterschiede waren nicht signifikant. (I: 164.7 ± 38.0 / II: 159.4 ± 42.2 / III: 164.6 ± 40.5 / IV: 164.2 ± 36.6 ng AI/h·20ml). Es zeigten sich jedoch von Niere zu Niere deutliche Unterschiede (siehe Abbildung 8).

Bei drei der vier untersuchten Nieren wurden im Mittel 4.8 ± 0.4 % der Gesamtreninmenge im Schnitt vor Inkubation freigesetzt (4.8%, 5.6%,4.1%), bei der vierten Niere lag der prozentuale Anteil bedeutend darüber (28.3%).

3.3.2. Einfluß von Pharmaka auf die Reninfreisetzung

3.3.2.1. l-Ascorbinsäure

L-Ascorbinsäure, als Antioxydans bei der Inkubation mit Noradrenalin dem Medium zugesetzt, hatte in der Konzentration 8 10^{-3}M (109) keinen Einfluß auf die Reninsekretion (97.3 ± 7.4 % der Kontrollperiode).

3.3.2.2. l-Noradrenalin

L-Noradrenalin in Anwesenheit von l-Ascorbinsäure hatte in den Konzentrationen 10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-7}M und 10^{-8}M keinen Einfluß auf die Reninsekretion. Dagegen wurde bei 10^{-6}M signifikant weniger Renin im Medium gefunden (79.2 ± 0.8 % der Kontrollperiode / $p < 0.001$). In der nachfolgenden Inkubationsperiode ohne Noradrenalin kehrte die Reninkonzentration wieder zum Ausgangswert zurück.

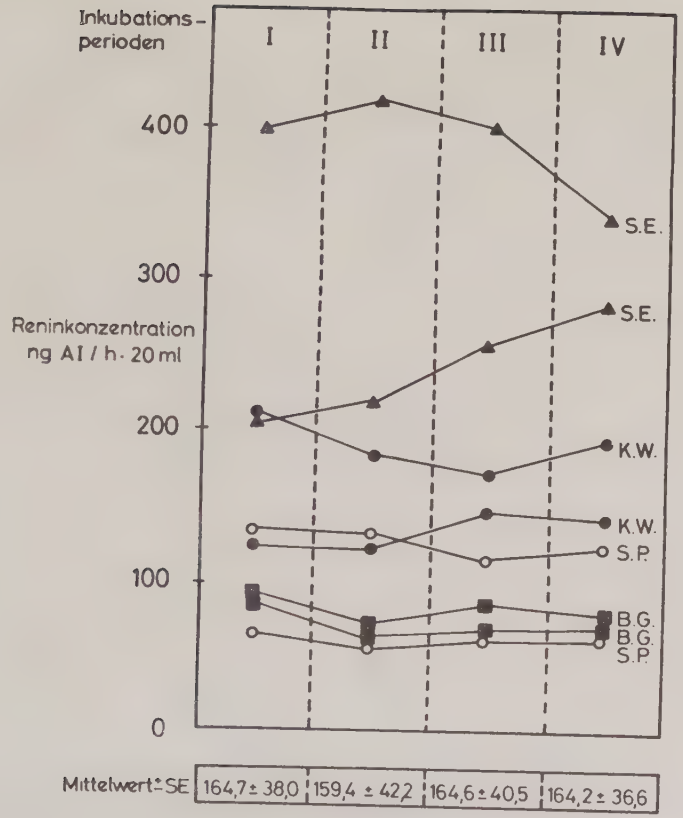


Abbildung 8: Reninkonzentration im Medium bei Inkubation über vier Perioden zu je 20 Minuten mit zwischenzeitlichem Badwechsel (Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer mit Carbogen durchströmung) n=8.

Bei 10^{-5}M l-Noradrenalin im Medium war die Reninfreisetzung nicht verändert (100.3 ± 0.7 % der Kontrollperiode), jedoch stieg die Reninkonzentration im Medium in der folgenden Periode IV auf 133.3 ± 4.2 % der Periode II an. Der Anstieg war gegenüber Periode II und gegenüber Periode III signifikant ($p < 0.005$ / s. Abb. 9 und 10).

3.3.2.3. dl-Isoproterenol

Dl-Isoproterenol in den Konzentrationen 10^{-8}M bis 10^{-4}M bewirkte keine Veränderung der Reninfreisetzung (10^{-8}M: 97.7 ± 4.5 % / 10^{-7}M: 95.1 ± 5.2 % / 10^{-6}M: 97.9 ± 3.6 % / 10^{-5}M: 101.2 ± 4.1 % / 10-4 M: 98.7 ± 10.5 %). Siehe Abb. 9.

3.3.2.4. dl-Propranolol

Dl-Propranolol hemmte die Reninfreisetzung dosisabhängig. Bei 10^{-8}M und 10^{-7}M wurde keine Veränderung beobachtet, bei 10^{-6}M sank die Reninkonzentration auf 87.6 ± 10.1 % (nicht signifikant). Bei 10^{-5}M betrug die Reninfreisetzung nur noch 75.1 ± 6.7 % der Kontrollperiode ($p < 0.025$). Bei beiden Konzentrationen folgte kein Wiederanstieg der Reninfreisetzung in der folgenden Periode (s. Abb.9 und 11).

3.3.2.5. l-Noradrenalin plus dl-Propranolol

Nach Inkubation der Schnitte mit dl-Propranolol (10^{-5}M) über die ersten drei Perioden verstärkte l-Noradrenalin in Periode III die durch dl-Propranolol bewirkte Hemmung der Reninfreisetzung. Die Reninkonzentration betrug 71.2 ± 6.5 % der nur mit dl-Propranolol inkubierten Kontrollperiode ($p < 0.01$ / Abb. 9 und 12).

3.3.2.6. dl-Isoproterenol plus dl-Propranolol

Dl-Isoproterenol (10^{-6}M) bewirkte auch in Gegenwart von Propranolol (10^{-5}M) keine Veränderung der Reninfreisetzung (101.9 ± 9.4 %).

3.3.3. Freisetzung von LDH und GOT

Als Gradmesser für das Ausmaß der Zellschädigung wurde die Konzentration von LDH und GOT im Medium bestimmt. Die Konzentration von LDH, (im Vorinkubat: 137.0 ± 16.7 IE/l) nahm von 54.5 ± 6.8 IE/l (PI) auf 26.3 ± 6.9 IE/l (PIV) ab. Die Konz. von GOT (Vorinkubat: 11.0 ± 2.2) nahm von 7.0 ± 0.9 IE/l auf 4.5 ± 0.7 IE/l ab (s. Abb. 13).

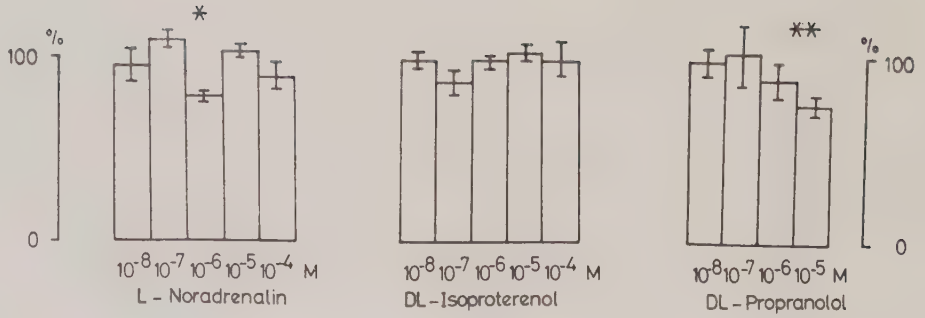


Abbildung 9: Reninfreisetzung ins Medium in Anwesenheit von verschiedenen Pharmaka. Ordinate: Prozent Reninkonzentration in Bezug auf die vorangehende Inkubationsperiode (n=4).

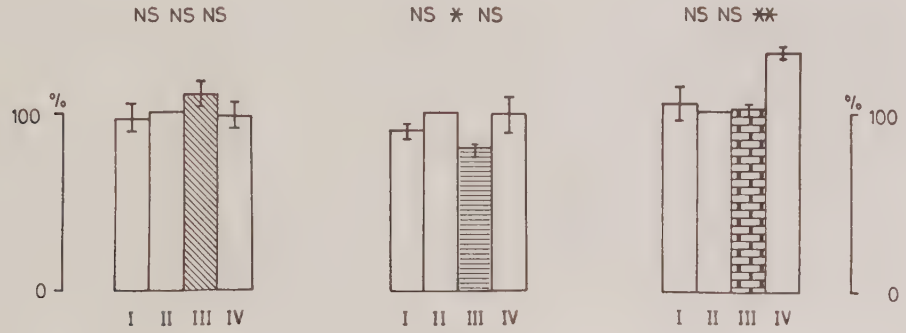
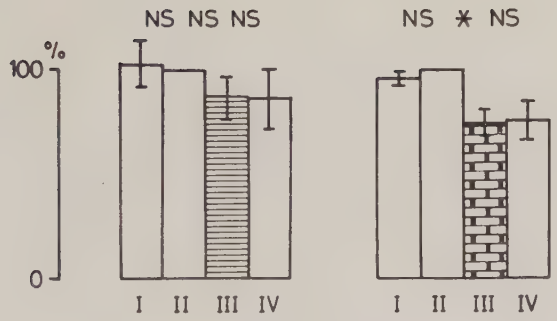


Abbildung 10: Reninfreisetzung ins Medium in Anwesenheit von l-Noradrenalin in Periode III.
▨: 10^{-7}M, ▤: 10^{-6}M, ▦: 10^{-5}M. Periode II = Kontrollperiode = 100%.
NS: nicht signifikant / * : $p < 0.001$ / ** : $p < 0.005$. n=4



Abbbildung 11: Reninfreisetzung ins Medium in Anwesenheit von dl-Propranolol. ▤: 10^{-6}M / ▦: 10^{-5}M (n=4). Periode II = Kontrolle = 100% / * : $p < 0.025$

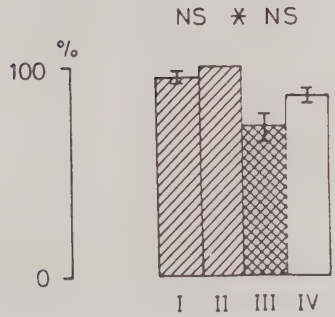


Abbildung 12: Reninfreisetzung ins Medium. Die durch dl-Propranolol (10^{-5}M) schon erniedrigte Reninfreisetzung wird durch l-Noradrenalin (10^{-6}M) weiter gesenkt (n=4) * : $p < 0.01$
▨ : Periode I,II: dl-Propranolol (10^{-5}M)
▩ : Periode III: dl-Propr. (10^{-5}M) + l-Noradrenalin (10^{-6}M)
Periode II = Kontrolle = 100%.

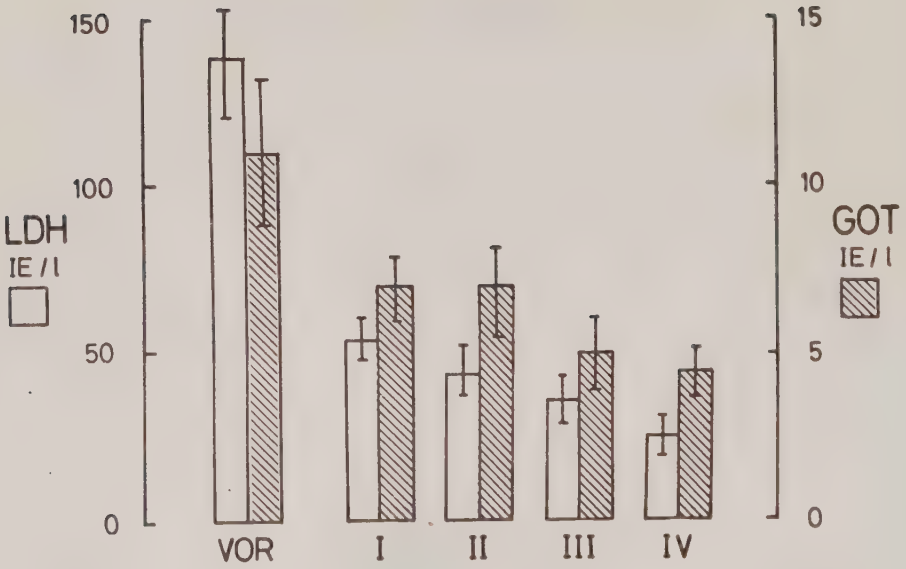


Abbildung 13: Konzentration von LDH und GOT im Medium von Vorinkubat und vier Hauptinkubationen (n=6).

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methode

Als in-vitro-Modell zur Untersuchung der Reninfreisetzung, bei dem der juxtaglomeruläre Apparat bzw. die reninsezernierenden Zellen hämodynamischen und neurogenen Einflüssen entzogen sind, wurden isolierte Nierencortexzellen (52), isolierte Glomeruli (9,14,73) und Nierenschnitte verwendet.

Als erster arbeitete 1969 DE JONG mit Nierenschnitten (56). Seither wurde die Reninfreisetzung wie bei DE JONG fast ausschließlich an tierischen Nieren - meist Rattennieren - untersucht. Lediglich ROSSET und VEYRAT (85,103) benutzten menschliche Nierenschnitte. Sie verwendeten Operationspräparate von Patienten mit Nierenarterienthrombose, Nierentuberkulose, chronischer Pyelonephritis und chronischer Glomerulonephritis, also pathologisch verändertes Nierengewebe.

Das von uns untersuchte Gewebe war bei der pathologisch-histologischen Untersuchung als unauffällig (n=4), leicht hydronephrotisch (n=1), Hyperplasie der JGA (n=1) und Nierentuberkulose (n=1) beschrieben worden. Die letzten beiden Nieren wurden nicht zur Untersuchung des Einflusses von Pharmaka verwendet.

Die Ergebnisse der Bestimmung der 'Renalen Reninkonzentration' (RRC) aus pathologisch-histologisch unauffälligem Nierengewebe können als "Normalwerte" bezeichnet werden (eine Bewertung, die natürlich wegen der geringen Zahl der untersuchten Nieren eine gewisse Einschränkung erfahren muß). Diese Normalwerte lagen zwischen 0.15 (Corticalis/c) bzw. 0.12 (Corticomedullaris/cm) und 1.08 (c) bzw. 0.78 (cm) /ug AI/h·mgEW. WOWRA (113) fand in Schrumpfnieren mit 3.6 $\pm$ 3.2 (c) bzw. 4.1 $\pm$ 4.3 (cm) /ug AI/h·mgEW deutlich höhere Werte und bei maligner Nephrosklerose mit 75.8 $\pm$ 114.9 (c) bzw. 10.4 $\pm$ 9.7 (cm) extrem höhere Werte als in unserem "Normalgewebe". Eine von uns untersuchte Niere (F.K.), die durch ein Ganglioneurom teilweise mangeldurchblutet war, mit histologisch gesicherter Hyperplasie des JGA

wies in den ischämischen Bezirken ebenfalls eine ausgeprägte Erhöhung der RRC auf: 8.78 (c) bzw. 3.73 (cm) /ug AI/h·mgEW. Eine tuberkulös veränderte Niere hatte Werte im unteren Normbereich: 0.25 (c) bzw. 0.22 (cm) /ug AI/h·mgEW, eine leicht hydronephrotisch veränderte Niere etwas erhöhte Werte: 2.50 (c) bzw. 1.32 (cm) /ug AI/h mgEW.

Bei der Inkubation von Nierenschnitten fanden die meisten Autoren (18,19,22,23,46,72,104,105) über einen Zeitraum von 60 bis 120 Minuten eine lineare, temperaturabhängige (23,46,56) Reninfreisetzung. DE VITO (104) dagegen beschrieb in der zweiten Inkubationsstunde signifikant weniger Reninfreisetzung als in der ersten. Unsere Ergebnisse während der kontinuierlichen Inkubation, bei denen einem raschen Anstieg der Reninfreisetzung in den ersten 10 Minuten ein deutlicher Abfall der Reninkonzentration im Medium folgt, lassen sich mit diesen Arbeiten nicht in Einklang bringen.

Die Abnahme der Reninkonzentration im Medium bei 37°C unter Carbogendurchströmung nach anfänglich hoher Reninfreisetzung im Unterschied zum linearen Anstieg der Konzentration bei 4°C ohne Carbogendurchströmung kann entweder Folge einer Abgabe von Renin abbauenden bzw. inaktivierenden Substanzen vom Schnitt ins Medium oder Folge der Abgabe von Hemmstoffen der Renin-Substrat-Reaktion sein. Möglich ist auch, daß aus dem Schnitt Angiotensinasen freigesetzt werden, die im Substratansatz das dort gebildete Angiotensin abbauen und so eine Abnahme der Reninkonznetration vortäuschen. Hemmstoffe der Renin-Substrat-Reaktion wurden aus Nieren von Mensch und Ratte schon isoliert (5,58,87,91,97), desgleichen ein Inhibitor, der zusammen mit Renin bei 37°C einen inaktiven Komplex bildet (60).

Unsere Untersuchungen (3.2.3.) zeigten, daß von uns nicht näher definierte Substanzen, die aus dem Nierengewebe ins Medium abgegeben wurden, zumindest teilweise für die Inaktivierung des Renins bzw. für die Hemmung der Renin-Substrat-Reaktion oder für die Zerstörung des gebildeten Angiotensins verantwortlich sind.

Bei 4°C ohne Carbogendurchströmung scheinen die Renin beeinflussenden Substanzen nicht wirksam zu sein. Bei 37°C ohne Carbogen steigt die Reninkonzentration bis ungefähr zur 30. Minute steil an, um dann in ein Plateau überzugehen. Eine Interpretation dieses Verhaltens ist schwierig, möglicherweise spielt der ohne Carbogendurchströmung ansteigende pH-Wert eine Rolle.

Verschiedene Autoren beschreiben eine Inkubation mit Wechsel des Inkubationsmediums nach gewissen Zeitabständen: HENRY et al. (49), VEYRAT und ROSSET (103) und WEINBERGER et al. (109) erzielten damit eine konstante Reninfreisetzung über 80 Minuten. Diese Mitteilungen entsprechen unseren Ergebnissen einer Inkubation über 4 mal 20 Minuten. Die Tatsache, daß sowohl von den genannten Autoren als auch von uns im Gegensatz zur kontinuierlichen Inkubation hier eine konstante Reninfreisetzung gefunden wurde, ist wohl damit zu erklären, daß in alle vier Medien die gleiche, bei der jeweils kurzen Dauer der Inkubationsperiode relativ geringe Menge an "Störfaktoren" freigesetzt wurde. Weitere Autoren konnten bei Inkubation mit Badwechsel keine konstante Reninfreisetzung finden: DESAULLES u.a. (32) fanden einen stetigen Abfall der Reninfreisetzung bis auf 69% in der dritten Periode. CORSINI u.a. (27) stellten zwischen der 30. und 60. Minute eine dreifach stärkere Freisetzung als in den ersten 30 Minuten fest.

4.2. Inkubation mit Pharmaka

Seit der Entdeckung von adrenergen Nervenendigungen am juxtaglomerulären Apparat der Niere (6,7,106), haben viele Autoren versucht, die Rolle dieser sympathischen Innervation aufzuklären. Bisher ist nicht vollständig geklärt, ob die sympathische Beeinflussung der Reninsekretion durch alpha- oder beta-Rezeptoren oder durch beide vermittelt wird.

In vivo sprechen die meisten Befunde für eine sympathische Stimulation der Reninfreisetzung vermittelt durch betaadrenerge Rezeptoren (30). ALs erste beobachteten VANDER (99) und WATHEN et a. (108)

einen Anstieg des Plasmareninspiegels nach Injektion von Adrenalin und Noradrenalin bei Hunden. In der Folgezeit berichteten zahlreiche Autoren, daß eine Erhöhung der Reninfreisetzung durch Katecholaminapplikation oder Stimulation der Nierennerven hervorgerufen werden kann, und daß diese Erhöhung durch beta-Blocker wie Propranolol oder alpha-Agonisten wie Methoxamin unterdrückt werden kann (3,4, 28,30,54,55,63,82,99,101,102,112). Die Stimulation der Reninfreisetzung kann durch reine beta-Agonisten wie Isoproterenol, nicht aber durch reine alpha-Agonisten erzielt werden (67,89,92).

Mit Noradrenalin, das vor allem alpha- aber auch beta-Rezeptoren erregt, wurden unterschiedliche Beobachtungen gemacht. VANDONGEN erreichte mit Noradrenalin in vasokonstriktorisch wirksamen Dosen erst nach alpha-Blockade eine gesteigerte Reninsekretion (101). JOHNSON et al. (54) und VANDER (99) konnten in vivo mit Noradrenalin auch ohne alpha-Blocker eine Steigerung der Reninsekretion erzielen.

Diese Resultate lassen vermuten, daß als adrenerge Kontrolle die Reninfreisetzung durch Stimulation der beta-Rezeptoren erhöht und durch Stimulation der alpha-Rezeptoren eine Erhöhung verhindert wird. Einige Autoren berichten jedoch, daß sowohl beta- als auch alpha-Blocker eine durch Orthostase erhöhte Reninstimulation verhindern (111,112) oder daß sowohl beta- als auch alpha-Agonisten die Plasma-Renin-Aktivität erhöhen (61).

Es ist in vivo jedoch schwierig, die direkte Wirkung der Katecholamine und des sympathischen Systems von der indirekten Wirkung auf den systemischen oder renalen Blutfluß zu unterscheiden. Adrenerge Konstriktion der afferenten Arteriole könnte den Perfusionsdruck der nachgeschalteten Anteile so vermindern, daß die reduzierte Dehnung der Arterienwand über den Barorezeptormechanismus die Reninfreisetzung stimuliert (115). Bei in-vitro-Modellen wie Nierenschnitten ist dieser indirekte Einfluß weitgehend ausgeschaltet. Auch bei in-vitro-Versuchen an Nierenschnitten und isolierten Cortexzellen wurde über unterschiedliche Ergebnisse berichtet:

MICHELAKIS et al. (69) konnten als erste an Zellsuspensionen von Hundenieren eine Stimulation der Reninfreisetzung in Anwesenheit von Adrenalin und Noradrenalin nachweisen. VEYRAT und ROSSET (85,103) bestätigten diese Ergebnisse für Noradrenalin an menschlichen Nierenschnitten. CORSINI et al. (27) und DE VITO (104) beobachteten keinen Effekt der Katecholamine auf die Reninfreisetzung aus Rattennierenschnitten. JOHNS et al. (52) konnten an isolierten Cortexzellen der Katze einen stimulierenden Effekt bei 10^{-4}M Adrenalin, Noradrenalin und Isoproterenol nachweisen.

WEINBERGER und Mitarbeiter (2,109) fanden an Nierenschnitten der Ratte eine Dosis-Wirkungsbeziehung für Adrenalin, Noradrenalin und Isoproterenol im Bereich 10^{-6}M bis 10^{-9}M, wenn Adrenalin und Noradrenalin durch Ascorbinsäure, die selbst keinen Einfluß auf die Reninfreisetzung hatte, vor Oxydation geschützt wurden. Die erhöhte Freisetzung, die durch diese Substanzen bewirkt wurde, konnte durch dl- und l-Propranolol vermindert werden, nicht jedoch durch d-Propranolol, das nur membranstabilisierende Eigenschaften hat.

NOLLY und Mitarbeiter (72) wiesen am gleichen Präparat für Noradrenalin in Konzentrationen von 10^{-6}M eine Stimulation der Reninsekretion nach. Propranolol hatte keinen Einfluß auf die Basalsekretion, jedoch hemmten dl- und l-Propranolol die Reninantwort auf Noradrenalin.

DESAULLES et al. (32) konnten ebenfalls an Rattennierenschnitten für Isoproterenol (10^{-10}M bis 10^{-8}M) die gleiche Stimulation feststellen für Noradrenalin (10^{-12}M bis 10^{-7}M) ebenfalls eine Stimulation, die sich jedoch mit steigender Konzentration in eine Hemmung der Reninfreisetzung umwandelte (10^{-5}M bis 10^{-4}M). dl-Propranolol allein hatte in den Konzentration 10^{-5} M und 10^{-4}M einen agonistischen Effekt, d.h. es führte zu Erhöhung der Reninfreisetzung, bei 10^{-3}M und 10^{-2}M hemmte es die Reninsekretion, was aber vom Autor wegen fehlender Reversibilität als toxisch gedeutet wurde.

CAPPONI und andere (21,22,23) beobachteten an Rattennierenschnitten einen signifikanten Anstieg der Reninfreisetzung in Anwesenheit von

Isoproterenol (10^{-8}M bis 10^{-5}M), der durch dl-Propranolol teilweise gehemmt werden konnte. In höheren Dosen hatte Propranolol einen deutlich agonistischen Effekt, d.h. es stimulierte die Reninfreisetzung. Adrenalin und Noradrenalin (10^{-5}M) hemmten die Reninfreisetzung. Der alpha-Blocker Phenoxybenzamin (10^{-5}M) hob nicht nur diese Sekretionshemmung auf, sondern stimulierte darüber hinaus die Reninfreisetzung.

Unsere Untersuchungen an menschlichen Nierenschnitten zeigten in Anwesenheit von Noradrenalin in der Konzentration 10^{-6}M eine signifikant geringere Reninfreisetzung als ohne Zusatz. Dieser Effekt von Noradrenalin wurde durch die Anwesenheit von dl-Propranolol (10^{-6}M) noch verstärkt. Niedrigere und höhere Konzentrationen (10^{-7}M, 10^{-8}M und 10^{-5}M) von Noradrenalin zeigten keinen Effekt. Bei 10^{-5}M war in der auf die mit Noradrenalin inkubierte Periode folgenden Kontrollperiode IV eine deutliche Zunahme der Reninkonzentration im Medium zu beobachten. Diese Ergebnisse bedürfen noch weiterer Klärung.

Dl-Propranolol zeigte in der Konzentration 10^{-5}M eine signifikante Hemmung der basalen Reninsekretion, was auch von DESAULLES (32) beobachtet wurde. Diese Hemmung der Basalsekretion ist in der folgenden Inkubationsperiode nicht reversibel. Das läßt an einen toxischen Effekt denken. Geringere Konzentrationen von dl-Propranolol zeigten keinen signifikanten Effekt auf die Reninfreisetzung.

Mit Isoproterenol, das vielfach bei in vivo und in vitro-Versuchen als potenter Stimulator der Reninfreisetzung beschrieben wurde (4, 23, 51,63,109), konnten wir bei keiner der gewählten Konzentrationen (10^{-8}M bis 10^{-5}M) eine Erhöhung der Freisetzung von Renin feststellen.

Durch keines der von uns untersuchten Pharmaka konnte eine Stimulation der Reninsekretion erzielt werden. Möglicherweise erfolgte unter den vorliegenden Bedingungen, wie auch CORSINI et al. (27) sowie BRAVERMAN et al. (18) vermuteten, eine maximale Stimulation der Reninbasalsekretion, die zwar durch dl-Propranolol hemmbar, durch Isoproterenol jedoch nicht weiter stimulierbar ist.

5. Zusammenfassung

Bei vier menschlichen Tumornieren wurden in makroskopisch unveränderten, pathologisch-histologisch unauffälligen Bezirken in der Zona corticalis Reninkonzentrationen zwischen 0.15 und 1.08 /ug AI/h mgEW in der Zona corticomedullaris zwischen 0.12 und 0.78 /ug AI/h mgEW gefunden.

Die Freisetzung von Renin aus menschlichen Nierenschnitten in ein Inkubationsmedium wurde untersucht. Die Reninsekretion während kontinuierlicher Inkubation über 180 Minuten bei 37°C in Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer in Anwesenheit von O_2/CO_2 (95%:5%) stieg in den ersten 10 Minuten steil an, fiel ab der 30. Minute deutlich ab und blieb bis zum Inkubationsende unverändert niedrig. Als Ursache der deutlichen zeitabhängigen Abnahme der Reninkonzentration im Inkubationsmedium konnte die Abgabe von bestimmten Substanzen aus dem Schnitt ins Medium wahrscheinlich gemacht werden. In Frage kommen Renin abbauende, inaktivierende oder die Renin-Substrat-Reaktion hemmende Stoffe sowie Angiotensinasen, die das in der R-S-Reaktion entstehende Angiotensin zerstören.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Wechsel des Inkubationsmediums nach jeweils 20 Minuten eine kontinuierliche Abgabe von Renin ins Medium über eine Zeitraum von insgesamt 80 Minuten.

In Anwesenheit von l-Noradrenalin (10^{-6}M) konnte eine Hemmung der Reninfreisetzung beobachtet werden. L-Noradrenalin in den Konzentrationen 10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-7}M und 10^{-8}M war ohne Einfluß. Dl-Propranolol (10^{-6}M) hemmte die Reninfreisetzung. Diese Hemmung konnte durch die gleichzeitige Gabe von 10^{-6}M l-Noradrenalin noch verstärkt werden. Dl-Isoproterenol in Konzentrationen von 10^{-8}M bis 10^{-4}M zeigte keinen Effekt auf die Reninsekretion.

6. Literaturverzeichnis

1. AOI W., HENRY D.P., WEINBERGER M.H.: Evidence for a physiological role of renal sympathetic nerves in adrenergic stimulation of renin release in the rat. Circ. Res. 38, 123-126, (1976).

2. AOI W., WADE M.B., ROSNER D.R., WEINBERGER M.H.: Renin release by rat kidney slices in vitro, effects of cations and catecholamines. Am.J.Physiol. 227, 630-634, (1974).

3. ASSAYKEEN T.A., CLAYTON P.L., GOLDFIEN A., GANONG W.F.: Effect of alpha- and beta-adrenergic blocking agents on the renin response to hypoglycemia and epinephrine in dogs. Endocrinology 87, 1318-1322, (1970).

4. ASSAYKEEN T.A., TANIGAWA H., ALLISON D.J.: Effect of adrenoceptor blocking agents on the renin response to isoproterenol in dogs. Europ. J. Pharmacol. 26, 285-297, (1974).

5. BAGGIO B., FAVARD S., ANTONELLO A., BORSATTI A.: Preliminary studies on a rat kidney phospholipase A_2 activating renin preinhibitor. Res. Exp. Med. 169, 77-81, (1976).

6. BARAJAS L., The innervation of the juxtaglomerular apparatus. Lab. Invest. 13, 916-929, (1964).

7. BARAJAS L., LATTA H.: Structure of the juxtaglomerular apparatus. Circ. Res. 20-21, Suppl. II, 15-28, (1967).

8. BARRETT J.D., EGGENA P., SAMBHI M.P.: "Big, big renin", enzymatic and partial physical characterization of a new high molecular weight renin from normal human kidney. Circ. Res. 40-41, Suppl.II, 7-11, (1977).

9. BAUMBACH L., LEYSSAC P.P., SKINNER S.L.: Studies on renin release from isolated superfused glomeruli: effects of temperature, urea, ouabain, and ethacrynic acid. J.Physiol. 258, 243-256, (1976).

10. BECTON/DICKINSON: Renin activity radioimmunoassay kit (^{125}J). Protocol and explanation of the test kit. Becton, Dickinson & Co., Orangeburg, New York, (1977).

11. BLAINE E.H., DAVIS J.O.: Evidence for a renal vascular mechanism in renin release: new observations with graded stimulation by aortic constriction. Circ. Res. 28-29,Suppl.II, 118-126, (1971).

12. BLAINE E.H., DAVIS J.O., WITTY R.T.: Renin release after hemorrhage and after suprarenal aortic constriction in dogs without sodium delivery to the macula densa. Circ. Res. 27, 1081-1089, (1970).

13. BLAIR-WEST J.R., COGHLAN J.P., DENTON D.A., FUNDER J.W., SCOGGINS B.A., WRIGHT R.D.: The effect of the heptapeptide (2-8) and the hexapeptide (3-8) fragments of angiotensin II on aldosterone secretion. J.Clin.Endocrin.Metab. 32, 575-578, (1971).

14. BLENDSTRUP K., LEYSSAC P.P., POULSEN K., SKINNER S.L.: Characteristics of renin release from isolated superfused glomeruli in vitro. J. Physiol. 246, 653-672, (1975).

15. BOUCHER R., GENEST J.: Measurement of renin and of angiotensin (extraction and bioassay) in 'Angiotensin' Hrsg.: Page I.H., Bumpus F.H., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1974).

16. BOUCHER R., MENARD J., GENEST J.: A micromethod for measurement of renin in the plasma and kidney of rats. Can. J. Physiol. Pharmacol. 45, 881-890, (1967).

17. BOZOVIC L., EFENDIC S.: Renin secretion in vitro from rat kidney cortex slices. Acta Endocrin. 60, 550-554, (1969)

18. BRAVERMAN B., FREEMAN R.H., ROSTORFER H.H.: The quantification of renin liberated in vitro from rat kidney slices. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 67-71 (1970).

19. BRAVERMAN B., FREEMAN R.H., ROSTORFER H.H.: The influence of dietary sodium chlorid on in vitro renin release from rat kidney slices. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 81-88, (1971).

20. BUNAG R.D., PAGE I.H., McCUBBIN J.W.: Neural stimulation of release of renin. Circ. Res. 19, 851-858, (1966).

21. CAPPONI A.: Etudes sur la liberation de renin in vitro par des tranches de reins de rats. Thèse No. 1787, Genf, (1976)

22. CAPPONI A., GOURJON M., VALLOTTON M.B.: Effect of beta-blocking agents and angiotensin II on isoproterenol-stimulated renin release from rat kidney slices. Circ. Res. 40, Suppl. I, 89-93, (1977).

23. CAPPONI A., VALLOTTON M.B.: Renin release by rat kidney slices incubated in vitro; role of sodium and of alpha- and beta-receptors, and effect of vincristine. Circ. Res. 39, 200-203, (1976)

24. CHRISTENSEN J.A., MEYER D.S., BOHLE A.: The structure of the human juxtaglomerular apparatus. Virchows Arch. 367, 83-92, (1972).

25. CHURCHILL P.C., MALVIN R.L., OPAVA S.C.: Evidence for baroreceptor control of renin release. Nephron 13, 382-389 (1974).

26. COOKE C.R., BROWN T.C., ZACHERLE B.J., WALKER G.W.: The effect of altered sodium concentration in the distal nephron segments on renin release. J. Clin. Invest. 49, 1630-1638, (1970).

27. CORSINI W.A., CROSSLAN K.L., BAILIE M.D.: Renin secretion by rat kidney slices in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145, 403-406, (1974).

28. DAVIES R., SLATER J.D.H.: Is the adrenergic control of renin dominant in man? Lancet 1976 II, 594-596.

29. DAVIS J.O.: The control of renin release. Am. J. Med. 55, 333-350, (1973).

30. DAVIS J.O., FREEMAN R.H.: Mechanisms regulating renin release. Physiol. Rev. 56, 1-56, (1976).

31. DAY R.P., LUETSCHER J.A., GONZALES G.M.: Occurence of big renin in human plasma, amniotic fluid, and kidney extracts. J. Clin. Endocrin. Metab. 40, 1078-1084, (1975).

32. DESAULLES E., FORLER C., VELLY J., SCHWARTZ J.: Effect of catecholamines on renin release in vitro. Biomedicine 23, 433-439, (1975).

33. DiBONA G.F.: Effect of mannitol diuresis and ureteral occlusion on distal tubular reabsorption. Am. J. Physiol. 221, 511-514, (1971).

34. EDELMAN R., HARTROFT P.M.: Localization of renin in juxtaglomerular cells of rabbit and dog through the use of the fluorescent-antibody technic. Circ. Res. 9, 1069-1077, (1961).

35. FERRIS T.F., GORDEN P., MULROW P.J.: Rabbit uterus as a source of renin. Am. J. Physiol. 212, 698-702, (1967).

36. FRAY J.C.: Stretch receptor model for renin release with evidence from perfused rat kidney. Circ. Res. 231, 936-944, (1976)

37. FREEMAN R.H., DAVIS J.O., GOTSHALL R.W., JOHNSON J.A., SPIELMAN W.S.: The signal perceived by the macula densa during changes in renin release. Circ. Res. 35, 307-315, (1974).

38. GANGUILLET F., MIRKOVITCH V., ROBINSON J.W.L., GOMBA S.: Vérification de l'éfficacité d'une guillotine multilames pour la préparation standardisée de tranches tissulaires. Pflügers Arch. 341, 171-178, (1973).

39. GANTEN D., MARQUEZ-JULIO A., GRANGER P., HAYDUK K., KARSUNKY K.P. BOUCHER R., GENEST J.: Renin in dog brain: a renin-angiotensin-system, independent of that of the kidney, is present in brains of nephrectomized dogs. Am. J. Physiol. 221, 1733-1737, (1971).

40. GOORMATIGH N.: Existence of an endocrine gland in the media of the renal arterioles. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 42, 688-689, (1939).

41. GOULD A.B., SKEGGS L.T., KAHN J.R.: The presence of renin activity in blood vessel walls. J. Exp. Med. 119, 389-399, (1964).

42. GRANGER P., BOUCHER R., GENEST J.: A method for determination of renin activity in dog's plasma and renal tissues. Can. J. Physiol. Pharmacol. 48, 457-462, (1970).

43. GRANGER P., DAHLHEIM H., THURAU K.:Enzyme activities of the

single juxtaglomerular apparatus in the rat kidney. Kidney Int. 1, 78-88, (1972).

44. HAAS E., GOLDBLATT H., GIPSON E.C., LEWIS L.: Extraction, purification and assay of human renin free of angiotensinase. Circ. Res. 19, 739-749, (1966).

45. HABER E., KOERNER T., PAGE L.B., KLIMAN B., PURNODE A.: Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurement of plasma renin activity in normal human subjects. J. Clin. Endocrin. Metab. 29, 1349-1355, (1969).

46. HAMMERSEN G., KARSUNKY K.P., FISCHINGER J., ROSENTHAL J., TAUGNER R.: Einfluß der Natriumionenkonzentration auf die Reninabgabe aus Nierenschnitten und isolierte Glomerula. Pflügers Arch. 328, 344-355, (1971).

47. HAYDUK K.: Plasmatisches und extraplasmatisches Renin. Ein Beitrag zur Bedeutung der Gewebsrenine. Habilitatsionsschrift, Thieme Verlag Stuttgart, (1975).

48. HAYDUK K., BOUCHER R., GENEST J.: Renin activity content in various tissues of dogs under different physiopathological states. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 134, 252-255, (1970).

49. HENRY D.P., AOI W., WEINBERGER M.H.: The effects of dopamine on renin release in vitro. Endocrinology 101, 279-283, (1977).

50. HOFBAUER K.G., ZSCHIEDRICH H., HACKENTHAL E., GROSS F.: Function of the renin-angiotensin-system in the isolated perfused rat kidney. Circ. Res. 34-35 Suppl. I, 193-201, (1974).

51. INNES I.R., NICKERSON M.: Drugs acting on postganglionic adrenergic nerve endings and structures innervated by them. in: GOODMAN L.S., GILMAN A.: The pharmacological basis of therapeutics, Macmillan London, Toronto, New York, 478-523,(1970).

52. JOHNS E.J., RICHARDS H.K., SINGER B.: Effects of adrenaline, noradrenaline, isoprenaline and salbutamol on the production and release of renin by isolated renal cortical cells of the cat. Brit. J. Pharmacol. 53, 67-73, (1975).

53. JOHNSON J.A., DAVIS J.O, GOTSHALL R.W.,LOHMEIER T.E., DAVIS J.L., BRAVERMAN B.: Evidence for an intrarenal beta receptor in the control of renin release. Am. J. Physiol. 230, 410-418, (1976).

54. JOHNSON J.A., DAVIS J.O., WITTY R.T.: Effects of catecholamines and renal nerve stimulation on renin release in the non-filtering kidney. Circ. Res. 29, 646-653, (1971).

55. JOHNSON B.F., SMITH T.K., LABROOY J., BYE C.: The nature of the ß-adrenoreceptor controlling plasma renin activity in man. Clin. Sci. Mol. Med. 51, 113s-115s (1976).

56. DE JONG W.: Release of renin by rat kidney slices; relationsship to plasma renin after desoxycorticosteron and renal hypertension. Proc. Soc. Exp. Biol. 130, 85-88, (1969).

57. KALOYANIDES G.J., BASTRON R.D., DiBONA G.F.: Effect of ureteral clamping and increased renal arterial pressure on renin release. Am.J.Physiol. 225, 95-99, (1973).

58. KOTCHEN T.A., TALWALKAR R.T., WELCH W.J.: Inhibition of the in vitro renin reaction by circulating neutral lipids. Circ. Res. 41, Suppl. II, 46-48, (1977).

59. LARAGH J.H., ANGERS M., KELLY W.G., LIEBERMAN S.: Hypotensive agents and pressor substances - the effect of epinephrine, norepinephrine, angiotensin II, and others on the secretory rate of aldosterone in man. J. Am. Med. Ass. 174, 234-240, (1960).

60. LECKIE B.J., McCONNELL A.: A renin inhibitor from rabbit kidney. Conversion of a large inactive renin to a smaller active enzyme. Circ. Res. 36, 513-519, (1975).

61. LEENEN F.H.H., REDMOND D.P., McDONALD jr. R.H.: Alpha- and beta-adrenergic-induced renin release in man. Clin. Pharmacol. Therap. 18, 31-38, (1975).

62. LILIENFELD-TOAL H.v., OCHS H., WILDT L.: Prinzip und Anwendungsbereiche des Radioimmunoassay (V). Renin-Angiotensin-System. Med. Welt 27, 320-322 (1976).

63. LOEFFLER J.R., STOCKIGT J.R., GANONG W.F.: Effect of alpha- and beta-adrenergic blocking agents on the increase in renin secretion produced by stimulation of the renal nerves. Neuroendocrinology 10, 129-138, (1972).

64. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDAL R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, (1951).

65. MALL H.: Reningehalt menschlicher Nieren. Methodische Studien und Untersuchung spezieller Krankheitsbilder. Inaugural-Dissertation Tübingen (1975).

66. MENZIE J.W., MICHELAKIS A.M., YOSHIDA H.: Sympathetic nervous system and renin release from submaxillary glands and kidneys. Am. J. Physiol. 227, 1281-1284, (1974).

67. MEURER K.A.: Die Bedeutung des sympathico-adrenalen Systems für die Reninfreisetzung. Klin. Wochenschrift 40, 1001-1014, (1971).

68. MEYER P., MENARD J., PAPANICOLAOU N., ALEXANDRE J.M., DEVAUX C., MILLIEZ P.: Mechanisms of renin release following furosemid diuresis in rabbit. Am. J. Physiol. 215, 908-915, (1968).

69. MICHELAKIS A.M., CAUDLE J., LIDDLE G.W.: In vitro stimulation of renin production by epinephrine, norepinephrine, and cyclic AMP. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 748-753 (1969).

70. NASH F.D., ROSTORFER H.H., BAILIE M.D., WATHEN R.L., SCHNEIDER E.G.: Renin release. Relation to renal sodium load and dissociation from hemodynamic changes. Circ. Res. 22, 473-487, (1968).

71. NG. K.K.F., VANE J.R.: Conversion of angiotensin I to angiotensin II, Nature 216, 762-766, (1967).

72. NOLLY H.L., REID I.A., GANGONG W.F.: Effect of theophylline and adrenergic blocking drugs on the renin response to norepinephrine in vitro. Circ. Res. 35, 575-579, (1974).

73. OCHS H.G., LAMBERTS B., SALEH M., HEINTZ R.: Reninsekretion in vitro. Vergleich von Nierenschnitten und isolierten Glomeruli. Res. exp. Med. 160, 206-212, (1973).

74. OELKERS W., MOLZAHN M., SAMWER K.F., KREISER H., KUTSCHE H.: Reninabgabe aus Nierenschnitten in Abhängigkeit von der Elektrolytzusammensetzung des Mediums. Pflügers Arch. 321, 67-82, (1970),

75. OPARIL S., HABER E.; The renin-angiotensin-system. New Engl.J. Med. 291, 389-401 + 446-457, (1974).

76. ORTH H., KRAHE P., STEIGELMANN C., GROSS F.: An improved method for the determination of renin in rat kidneys. Pflügers Arch. 329, 125-135, (1971).

77. PAGE I.H., BUMPUS F.M.: Angiotensin. Handbook of exp. pharmacology, Band XXXVII. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1974).

78. PAGE I.H., McSWAIN B., KNAPP G.M., ANDRUS W.D.: Origin of renin activator. Am. J. Physiol. 135, 214-222, (1941).

79. PASSO S.S., ASSAYKEEN T.A., OTSUKA K., WISE B.L., GOLDFIEN A., GANONG W.F.: Effect of stimulation of the medulla oblongata on renin secretion in dogs. Neurodendocrinology 7, 1-10, (1971).

80. PEACH M.: The renin-angiotensin-system. Physiol. Rev. 57, 313-370, (1877).

81. PEART W.S.: Renin-angiotensin-system. New Engl. J. Med. 292, 302-306, (1975).

82. PETTINGER W.A., KEETON K., CAMPBELL W.B., HARPER D.C.: Evidence for a renal alpha-adrenergic receptor inhibiting renin release. Circ. Res. 38, 338-346, (1976).

83. REID I.A.: Is there a brain renin-angiotensin-system? Circ. Res. 41, 147-153, (1977).

84. ROSENTHAL J., BOUCHER R., ROJO-ORTEGA J., GENEST J.: Renin activity in aortic tissue of rats. Can. J. Physiol. Pharmacol. 47, 53-56, (1969).

85. ROSSET E., VEYRAT R.: Release of renin by human kidney slices, in vitro effect of angiotensin II, norepinephrine and aldosterone.

Eur. J. Clin. Biol. Res. 8,792-794, (1971).

86. SCHNERMANN J., PERSSON A.E.G., AGERUP B.: Tubuloglomerular feedback. Nonlinear relation between glomerular hydrostatic pressure and loop of Henle perfusion rate. J. Clin. Invest. 52, 862-869, (1973).

87. SEN S., SMEBY R.R., BUMBPUS F.M.: Isolation of a phospholipid renin inhibitor from kidney. Biochemistry 6, 1572-1581, (1967).

88. SIEGENTHALER W., WERNING C., VETTER W.: Nebennierenrinde, in SIEGENTHALER W.(Hrsg.): Klinische Pathophysiologie, 335-361, Thieme Verlag, Stuttgart, (1976).

89. SINAIKO A.R., MIRKIN B.L.: Isoproterenol evoked renin release from in situ perfused kidney. Circ. Res. 42, (1978), 381-385.

90. SKEGGS L.T., MARSH W.H., KAHN J.R., SHUMWAY N.P.: The existence of two forms of hypertensin. J. Exp. Med. 99, 275-282, (1954).

91. SMEBY R.R., SEN S., BUMBPUS F.M.: A naturally occuring renin inhibitor. Circ. Res. 20-21, Suppl. II, 129-134, (1967).

92. STRANG K.D., VANDONGEN R., POESSE M.H., BIRKENHAEGER W.H.: Failure of alpha-adrenergic stimulation by phenylephrine to enhance renin secretion in the isolated rat kidney. Eur. J. Pharmacol. 45, 140-144, (1977).

93. THURAU K.: Renal hemodynamics. Am. J. Med. 36, 698-719, (1964).

94. THURAU K.: Intrarenal action of angiotensin. in PAGE I.H., BUMPUS F.M. (Hrsg.): Angiotensin, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 475-489 (1974)

95. THURAU K.: Modification of angiotensin-mediated tubuloglomerular feedback by extracellular volume. Kidney International 8, Suppl. II, 202-207, (1975)

96. THURAU K., DAHLHEIM H., GRÜNER A., MASON J., GRANGER P.: Activation of renin in the single juxtaglomerular apparatus by sodium chlorid in the tubular fluid at the macula densa. Circ. Res. 30, Suppl. II, 182-186, (1972).

97. TINKER D.O., SCHWARTZ H.J., OSMOND D.H., ROSS L.J.: Dog kidney phospholipids and the question of renin inhibition.. Can. J. Biochem. 51, 863-875, (1973).

98. TOBIAN L., TOMBOULIAN A., JANACEK J.: The effect of high perfusion pressures on the granulation of juxtaglomerular cells in an isolated kidney. J. Clin. Invest. 38, 605-610, (1959).

99. VANDER A.J.: Effect of catecholamines and the renal nerves on renin secretion in anesthetized dogs. Am. J. Physiol. 209, 659-662, (1965).

100. VANDER A.J.: Control of renin release. Physiol. Rev. 47, 359-382, (1967).

101. VANDONGEN R., PEART W.S.: The inhibition of renin secretion by alpha-adrenergic stimulation in the isolated rat kidney. Clin. Sci. Mol. Med. 47, 471-479, (1974).

102. VANDONGEN R., REART W.S., BOYD G.W.: Adrenergic stimulation of renin in the isolated perfused rat kidney. Circ. Res. 32, 290-286, (1973).

103. VEYRAT R., ROSSET E.: In vitro renin release by human kidney slices: effect of norepinephrine, angiotensin I and II, and aldosterone. Hypertension '72, Springer Verlag, 44-54, (1972).

104. DE VITO E., GORDON S.B., CABRERA R.R., FASCIOLO J.C.: Release of renin by rat kidney slices. Am. J. Physiol. 219, 1036-1041, (1970).

105. DE VITO E., CABRERA R.R., FASCIOLO J.C.: Renin production and release by rat kidney slices. Am. J. Physiol. 219, 1042-1045, (1970)

106. WÅGERMARK J., UNGERSTEDT U., LJUNGQVIST A.: Sympathetic innervation of the juxtaglomerular cells of the kidney. Circ. Res. 22, 149-153, (1968).

107. WALDHÄUSL W.K., LUCAS C.P., CONN J.W., LUTZ J.H., COHEN E.L.: Studies on the partial isolation of human renin. Biochim.biophys.Acta 221, 536-548, (1970).

108. WATHEN R.L., KINGSBURY W.S., STOUDER D.A., SCHNEIDER E.C., ROSTORFER H.H.: Effects of infusion of catecholamines and angiotensin II on renin release in anesthetized dogs. Am. J. Physiol. 209, 1012-1024, (1965).

109. WEINBERGER M.H., AOI W., HENRY D.P.: Direct effect of beta-adrenergic stimulation on renin release by the rat kidney slice in vitro. Circ. Res. 37, 318-324, (1975).

110. WILTON A., JOSHI P.I.S.: Adrenergic receptors and renin release. Lancet 1977 I, 698-699.

111. WINER N., CHOKSHI D.S., YOON M.S., FREEMAN A.D.: Adrenergic receptor mediation of renin secretion. J.Clin.Endocrin.Metab. 29, 1168-1175, (1969).

112. WINER N., CHOSHI D.S., WALKENHORST W.G.: Effects of cyclic AMP, sympathomimetic amines, and adrenergic receptor antagonists on renin secretion. Circ. Res. 29, 239-248, (1971).

113. WOWRA B.: Radioimmunologische Reninbestimmung im menschlichen Nierengewebe. Methodische und diagnostische Studien. Inaugural-Dissertation, Tübingen, (1980).

114. YALOW R.S., BERSON S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Invest. 39, 1157-1175, (1960).

115. ZANCHETTI A., STELLA A.: Neural control of renin release. Clin. Sci. Mol. Med. 48, Suppl.II, 221-225, (1975).

116. ZANCHETTI A., STELLA A., LEONETTI G., MORGANTI A., TERZOLI L.: Control of renin release: a review of experimental evidence and clinical implications. Am. J. Cardiol. 37, 675-691, (1976).

Herzlich bedanken möchte ich mich bei

Herrn Professor Dr. med. Karl Hayduk für die Überlassung des Themas und die freundliche Bereitstellung aller notwendigen Geräte und Materialien.

Herrn Dr. med. Dr. rer.nat. Jürgen Beyer für zahllose Anregungen, Ratschläge und seinen intensiven persönlichen Einsatz.

Fräulein Gabriele Straub für ihre bereitwillige praktische Hilfe.

Lebenslauf

Am 25. April 1954 wurde ich, Michael Sauter, als Sohn des Dr. med Bruno Sauter und seiner Ehefrau Rosemarie geb. Lehr in Tuttlingen geboren. In Spaichingen besuchte ich Grundschule und das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium. Nach Ablegen der Reifeprüfung im Jahre 1973 begann ich das Studium der Medizin in Tübingen. 1976 legt ich die Ärztliche Vorprüfung ab. Das letzte Jahr des Medizinstudiums, das 'Praktische Jahr' absolvierte ich am Kreiskrankenhaus Reutlingen. Neben den Pflichtfächern Innere Medizin und Chirurgie lernte ich als Wahlfach die Kinderheilkunde kennen. 28. April 1980 schloß ich das Medizinstudium mit dem dritten und letzten Teil der Ärztlichen Prüfung ab und erwarb die Approbation als Arzt.
Gegenwärtig bin ich als Assistenzarzt auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Reutlingen tätig.

Druck und Gesamtherstellung:

Bölk & Schulz · Kopier- und Drucktechnik
Bismarckstr. 92
7400 Tübingen · Tel. 07071/32321